

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 878**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/52** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2013 E 13721289 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2839000**

54 Título: **Nuevo proceso para la producción y purificación de la enzima colagenasa de Vibrio alginolyticus**

30 Prioridad:

**18.04.2012 IT PD20120118**

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

**01.07.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VACCARO, SUSANNA;  
CAPUTO, MICHELE;  
CUPPARI, CHRISTIAN y  
GENNARI, GIOVANNI**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 575 878 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

Nuevo proceso para la producción y purificación de la enzima colagenasa de *Vibrio alginolyticus*

## 5 Campo de la invención

10 Las colagenasas son metaloenzimas con una actividad proteolítica que requiere del de zinc en el sitio activo con el fin de realizar su función específica de rompimiento del colágeno nativo. A diferencia de otras proteasas, pueden hidrolizar colágeno bajo condiciones de pH y temperatura fisiológicos. Se conocen en la técnica una cantidad de colagenasas producidas por las bacterias (*Vibrio*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*); las producidas por *Clostridium* (Santyl®, Noruxol®) son ampliamente utilizadas en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de úlceras de la piel de diversos orígenes, úlceras causadas por postración en cama, quemaduras de diferentes grados y cicatrices hipertróficas, porque rompen el colágeno presente en el tejido necrótico. Esto facilita la eliminación de restos celulares, que a menudo constituyen un obstáculo para la migración de células epiteliales durante el proceso de cicatrización de heridas y formación de nuevo epitelio (Rao, D.B. y colaboradores, 1975). Recientemente también se utilizó colagenasa de para propósitos similares (EP 1901755); esta patente describe composiciones exclusivamente lipofílicas (lipogeles) que contienen carragenano como agente estabilizador. Sin embargo, el papel inflamatorio generalmente desempeñado por esa sustancia es conocida por la persona experta. En cualquier caso, independientemente de su origen, la colagenasa tiene una estabilidad extremadamente baja en un portador acuoso, y por lo tanto siempre se formula en portadores totalmente lipofílicos; Santyl®, Noruxol® y Bionect Start® son ungüentos con una base totalmente lipofílica en la que la enzima nunca se distribuye uniformemente, y está sujeta a una pérdida significativa de la actividad con el tiempo.

25 El portador lipofílico asegura la estabilidad de la enzima y la capacidad de almacenamiento del producto farmacéutico, mientras que penaliza su actividad terapéutica; la colagenasa se libera del portador lipofílico muy lentamente, con el resultado de que su biodisponibilidad es muy limitada. La colagenasa también se puede utilizar para el tratamiento sistémico, en particular, por inyección, de trastornos tales como capsulitis adhesiva (hombro congelado), la contractura de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, celulitis y las adherencias postquirúrgicas. La estabilidad en el portador acuoso es crucial para estas aplicaciones. Un producto para tratamiento por inyección de la contractura de Dupuytren actualmente está en el mercado (una sustancia lipofílica reconstituida en el momento de uso), que contiene una mezcla de dos colagenasas en una relación en peso precisa, que se extraen y se purifican por fermentación de la bacteria *Clostridium histolyticum*.

35 Como ya se ha indicado, esta última es una de las fuentes más comunes de colagenasa; sin embargo, es un microorganismo patógeno, que necesita la fermentación anaeróbica (Mandl, I. y colaboradores, 1958, Arch Biochem Biophys, 74: 465-475).

40 La actividad colagenolítica de algunas cepas de *Achromobacter* fue identificada por primera vez en 1972 (Thomson, JA, maderas, DR y Welton, RL 1972), y los primeros estudios fueron posteriormente llevados a cabo sobre la cepa de *Achromobacter iophagus* (posteriormente reclasificada como *Vibrio Alginolyticus* quimiotipo *iophagus*, Emod, I. y colaboradores, 1983), que demostró la presencia de una colagenasa con alta actividad específica (Welton y Woods 1973). En cuanto a la elección del microorganismo a ser utilizado para producir colagenasa por fermentación, el uso de *Vibrio alginolyticus* es mucho más ventajoso que el de *Clostridium histolyticum*, porque es no patógeno y permite la fermentación que se realiza en un ambiente aeróbico, con considerables ventajas industriales. La patogenicidad de la cepa microbiana es un aspecto importante, porque cualquier impureza (residuos microbianos o de proteína) en el producto terminado pueden dar lugar a efectos secundarios graves. Trabajar con cepas patógenas obviamente requiere una atención especial en las etapas de purificación, y en consecuencia un proceso industrial complejo y costoso.

50 La colagenasa microbiana EC 3.4.24.3 producida a partir de *Vibrio alginolyticus* es una metaloproteasa de Zn<sup>2+</sup> que también se distingue de las colagenasas producidas por *Clostridium histolyticum* por un sinnúmero de razones:

- actúa específicamente sobre el péptido sintético Pz-Pro-Leu-Gly-Ala-D-Arg (donde PZ = 4-fenil azobencil oxicarbonilo), que es el sustrato sintético de elección para la evaluación de la actividad colagenolítica. La colagenasa de *V. Alginolyticus* producida de acuerdo con la presente invención es la única capaz de romper el colágeno en el enlace Leu-Gly (Keil, B., Gilles A.-M., Lecroisey, A., Hurion, N. y Tong, N.-T. 1975; Keil B. Matrix Suppl. 1992; 1: 127-33);
- tiene mucha mayor actividad proteolítica que el análogo obtenido a partir de *Clostridium Histolyticum*;
- tiene una especificidad en el sitio de escisión sobre colágeno nativo; escinde la cadena helicoidal de colágeno nativo en 2 sitios, preferiblemente a 3/4 desde el extremo terminal N en el enlace Y-Gly de la secuencia Pro-Y-Gly-Pro, donde Y es un aminoácido neutro. Por el contrario, la colagenasa de *Clostridium histolyticum* presenta diversos sitios de escisión de la cadena de colágeno nativo (Lecroisey, A. Keil, B. 1979);

65 La cepa *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* sólo produce una colagenasa, aunque el análisis por SDS-PAGE de los productos de purificación demuestra la presencia de diversas bandas con pesos moleculares diferentes, donde se mantiene la actividad colagenolítica. Estas especies de bajo peso molecular han sido atribuidas a un proceso de autoproteólisis de la enzima que es inhibida por reguladores formulados específicamente (Keil-Dlouha, V. 1976).

5 En 1992, Takeuchi y colaboradores clonaron toda la secuencia que codifica para la colagenasa de *Vibrio alginolyticus*. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos muestra que la colagenasa madura está formada por 739 aminoácidos con un peso molecular de 81.875 Da. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la colagenasa de *Vibrio alginolyticus* no presentan similitudes significativas con aquellas de otras colagenasas (Takeuchi, H., 1992). Hasta la fecha, los procesos para la producción de la enzima de la cepa en cuestión han producido rendimientos y productos bastante modestos con un grado insatisfactorio de pureza, especialmente para uso inyectable. La patente EP 01 15974 describe un procedimiento para la producción y purificación de la colagenasa de *V. alginolyticus*; el producto final es una mezcla de enzimas (colagenasa, proteasas neutras y endonucleasa), que sólo es estable después de la adición de fragmentos de colágeno de piel de bovino (ASF).

10 El material obtenido tiene un grado de pureza muy bajo. Por otra parte, la presencia de ASF puede crear problemas en el momento de la preparación de las formas farmacéuticas identificadas, en particular, ya que es un material de origen animal, cuando las composiciones farmacéuticas elegidas son administradas por inyección.

15 Además, como ya se ha indicado, las composiciones farmacéuticas actualmente conocidas toman la forma de una unguento, mientras que para aplicaciones tópicas y, sobre todo, para aplicaciones sistémicas, es esencial que la enzima colagenasa esté en forma muy pura y estable en un portador acuoso (para mejorar la distribución de la enzima en la composición); se prefiere absolutamente un portador acuoso para el tratamiento por inyección.

20 La presente invención supera estos problemas mediante la divulgación de un proceso innovador para la producción y purificación de la enzima colagenasa de *V. alginolyticus*, un proceso caracterizado por altos rendimientos, reproducibilidad, estabilidad y un alto grado de pureza del producto terminado. El producto terminado es también estable en solución acuosa y por lo tanto se puede almacenar durante largos períodos de tiempo, incluso a temperaturas que oscilan entre -20 y -80° C, sin sufrir daños importantes.

25 Debido al alto grado de pureza y especificidad de la escisión en la cadena de colágeno, la colagenasa reivindicada aquí también se puede utilizar para disociar tejidos y aislar grupos de células o células individuales para todos los procedimientos experimentales y terapéuticos que requieren células aisladas.

30 Descripción detallada de la invención

35 La presente invención reivindica un nuevo procedimiento para la producción y purificación de colagenasa microbiana (Colagenasa Microbiana EC 3.4.24.3) producida por la bacteria aeróbica no patógena *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* (NCIMB Número: 11038, sinónimo LMG 3418, en adelante denominada *Vibrio Alginolyticus*); dicho procedimiento proporciona altos niveles de producción de colagenasa con un proceso de fermentación estable, reproducible, económico. La secuencia de la colagenasa producida a partir de *Vibrio alginolyticus* de acuerdo con el proceso de producción y purificación descrito en esta memoria (SEQ ID NO: 1) se caracteriza por la supresión de los aminoácidos 1-75 en comparación con la secuencia de 814 aminoácidos codificada por el gen de la colagenasa de *V. alginolyticus* (en el presente documento se reporta como la SEQ ID NO: 2 que corresponde a la Colagenasa Microbiana EC 3.4.24.3). Por el proceso de la invención, se produce la proteína madura, que es el núcleo activo, que consiste de 40 739 aa, más precisamente del aa 76 a 814:

TACDLEALVTESSNQLISEILSQGATCVNQLFSAESRIQESVFSSDH  
 MYNIAKHTTTLAKGYTGGSDELETLFLYLRAGYYAEFYNDNISFIEWW  
 TPAVKESVDAFVNTASFYENSDRHGKVLSEVIITMDSAGLQHA YLPQVT  
 QWLTRWNDQYAQHWYMRNAVNGVFTILFGGQWNEQFVQIIGNQTDL  
 AKALGDFALRASSIGADEFMAANAGRELGRLTKYTGNASSVVKSQLS  
 RIFEQYEMYGRGDA VWLAAADTASYADCSEFGICNFETELKGLVLSQ  
 TYTCSPTIRILSQNMTQEQAACSKMGYEEGYFHQSLETGEQPVKDD  
 HNTQLQVNIFDSSTDYGKYAGPIFDISTDNGGMYLEGDPSQPGNIPNFIA  
 YEASYANADHFVWNLEHEYVHYLDGRFDLYGGFSHPTEKIVWWSEGI  
 AEYVAQENDNQALETILDGSTYTLSEIFETTYDGFVDRIYRWGYLAV

RFMFENHKDDVNQMLVETRQGNWINYKATITQWANLYQSEFEQWQQT  
 LVSNGAPNAVITANSKGVGESITFSSSENSTDPNGKIVSVLWDFGDGSTS  
 TQTKPTHQYGSEGEYSVLSVTDSEGLTATATHTVVISALGGNDTLPQD  
 CAVQSKVSGGRLTAGEPVCLANQQTIWLSVPAVNESSNLAITTGNGTG  
 NLKLEYSNSGWPDDTNLHGWSDNIGNGECITLSNQSNYWGYVKVSGD  
 FENAAIVVDFDAQKCRQ (SEQ ID NO:1)

5 Además, la colagenasa producida a partir de *Vibrio alginolyticus* de acuerdo con el procedimiento de la invención también presenta una actividad específica superior a aquella de otras colagenasas microbianas, es más pura y estable en solución acuosa, y se puede congelar sin daño significativo.

10 Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención es la colagenasa, obtenida de acuerdo con el proceso de producción y purificación descrito, para el uso en el tratamiento terapéutico de patologías caracterizadas por la acumulación de colágeno o en el tratamiento de defectos/imperfecciones que se benefician de la reducción de acumulaciones locales de colágeno; tales como, por ejemplo, vale la pena mencionarlo, úlceras en la piel de diversos orígenes, úlceras por postración en cama, quemaduras de diferentes grados, escaldaduras y cicatrices hipertróficas, celulitis, adherencias postquirúrgicas e incluso "hombro congelado" o capsulitis adhesiva, contractura de Dupuytren, enfermedad de Peyronie.

15 Un objetivo adicional de la presente invención son las composiciones farmacéuticas que contienen colagenasa obtenida de acuerdo con el proceso de producción y de purificación descrito, para el uso en el tratamiento terapéutico de trastornos caracterizados por la acumulación de colágeno o para el tratamiento de defectos/imperfecciones que se benefician de la reducción local de acumulaciones de colágeno; ejemplos son úlceras en la piel de diversos orígenes, úlceras por postración en cama, quemaduras de diferentes grados, escaldaduras, y cicatrices hipertróficas, celulitis, adherencias postquirúrgicas, capsulitis adhesiva (hombro congelado), contractura de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.

25 La colagenasa obtenida como se describe en el presente documento también es adecuada para su aplicación en la disociación y aislamiento del tejido de grupos de células o de células individuales. Esta aplicación se utiliza, por ejemplo, en el procedimiento de trasplante de células de los islotes de Langerhans para aislar las células de los islotes del tejido pancreático circundante, y en general en todos los procedimientos experimentales y terapéuticos que requieren la disociación del tejido.

30 La colagenasa obtenida por el procedimiento descrito a continuación se caracteriza por:

- peso molecular de 82 kDa;
- actividad específica entre 1000 y 1800 nkat/mg;
- pureza entre el 98,0 y el 100%;
- ausencia de contaminante microbianos y proteicos, específicamente ausencia de endotoxinas y ADN;
- 35 • estabilidad a un pH de entre 5,5 y 11;
- estabilidad en solución acuosa a una T que varía entre 4° y 40° C, particularmente estable a 37° C;
- estabilidad en solución acuosa a 4° C durante 30 días;
- estabilidad en solución acuosa a una T que oscila entre -20° C y -80° C durante 24-48 meses;
- 40 • capacidad de liofilización para obtener un polvo liofilizado estable.

Preferiblemente también se caracteriza por

- secuencia del terminal N: H<sub>2</sub>N-Thr-Ala-Cys-Asp-Leu-Glu-Ala-Leu-Val-Thr-Glu-Ser-Ser-Asn-Gln (SEQ ID NO: 3);
- inhibición por sales de Ag y Cu y el agente quelante EDTA;
- 45 • capacidad de almacenamiento a temperaturas que oscilan entre -20 y -80° C, es decir, en forma congelada, sin pérdida significativa de actividad de la enzimática (5-15%).

El proceso de producción y purificación de colagenasa de acuerdo con la invención comprende las siguientes etapas:

- 50 Etapa A: La inoculación de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* en un matraz Erlenmeyer y la fermentación con caldo de cultivo de origen animal no bovino;
- Etapa B: Clarificación del caldo fermentado así obtenido por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF1) con casetes de corte de peso molecular de 100-500 kD (MWCO), preferiblemente de 300 kD;
- Etapa C: Diálisis y concentración del medio clarificado obtenido en la etapa B, por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF2) con casetes de MWCO de 5-30 kD, preferentemente MWCO de 10 kD;
- 55 Etapa D: Purificación de la solución que contiene colagenasa obtenida en la Etapa C, por resina de intercambio aniónico

- que porta grupos básicos débiles, a un pH de entre 6,9 y 7,4, preferiblemente a un pH de 7,1;
- Etapa E: Diálisis y concentración de las fracciones recolectadas que tienen actividad colagenolítica, procedente de la etapa D, por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF3) con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferentemente MWCO de 30 kD;
- 5 Etapa F: Purificación de la solución así obtenida, por la resina de intercambio aniónico que porta grupos básicos fuertes, a un pH de entre 6,9 y 7,4, preferiblemente a un pH de 7,1;
- Etapa G: Diafiltración y concentración de las fracciones con actividad colagenolítica  $\geq 95\%$  procedente de la etapa F, por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF4) con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferentemente MWCO de 30 kD;
- 10 Etapa H: Filtración de la solución que contiene colagenasa obtenida de este modo, a través de un filtro absoluto de 0,2  $\mu\text{m}$ , y almacenamiento a una temperatura de entre  $-20^\circ$  y  $-80^\circ$  C.
- Las pruebas con los materiales y métodos descritos en el párrafo "Métodos de ensayo" más abajo se llevan a cabo al final de cada etapa.
- 15 Etapa A: es un proceso de fermentación discontinuo; se prepara el inóculo en un matraz Erlenmeyer que contiene un caldo de cultivo formado por una peptona de origen animal no bovino, tal como de origen porcino, o una mezcla de peptonas de animal no bovino y origen vegetal, NaCl,  $\text{CaCl}_2$  y TRIS (tris-hidroximetil-aminometano), a un pH de entre 6,9 y 7,4, preferiblemente 7,1. Cuando la densidad óptica medida a 600 nm ( $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ ) alcanza un valor de entre 1 y 4, el inóculo está listo para ser transferido al fermentador.
- 20 El medio utilizado para la fermentación es el mismo que se utiliza para preparar el inóculo, con la adición de una pequeña cantidad de antiespumante para evitar la formación de espuma debido a la aireación y agitación.
- 25 Una fermentación tiene una duración de 14-20 horas, normalmente 16 horas. Durante la fermentación, se toman muestras mediante un procedimiento estéril para comprobar la pureza,  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ , la actividad enzimática y el pH.
- Cuando la actividad de la enzima es  $\geq 25.000$  nkat/litro, se termina la fermentación y se añade  $\text{CaCl}_2$  para estabilizar la enzima. La temperatura se reduce hasta aprox.  $8^\circ$  C, y se deja la mezcla bajo agitación.
- 30 Se llevan a cabo las siguientes pruebas de control en la solución obtenida en la etapa A:  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ ; pH; actividad enzimática; concentración de la proteína; SDS-PAGE.
- El caldo de fermentación procedente de la etapa A presenta, además de la colagenasa de interés, otras proteasas producidas por la bacteria durante la fermentación (principalmente serina proteasa), agregados de proteína con alto peso molecular y residuos del medio.
- 35 Etapa B: el caldo fermentado procedente de la etapa A se clarifica por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF1) con casetes de MWCO de 100-500 kD, preferentemente 300 kD; esto elimina las células microbianas y los agregados de proteínas de alto peso molecular.
- 40 Las siguientes pruebas de control se llevan a cabo en la solución obtenida en la etapa B: pH; actividad enzimática; concentración de proteína; SDS-PAGE; ensayo de caseinasa.
- 45 Etapa C: el medio clarificado que se origina en la etapa B se concentra y se dializa por ultrafiltración con casetes de MWCO de 5-30 kD, preferiblemente MWCO de 10 kD, aprox. 15-25 veces. La solución obtenida en la etapa C presenta típicamente una actividad enzimática de 500 a 700 nkat/ml, y es estable durante 12 meses a  $-20^\circ$  C. El propósito de la filtración de flujo tangencial con casetes de MWCO de 5-30 kD es reducir considerablemente el volumen y reemplazar el medio de cultivo con TRIS-HCl 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, regulador de pH 7,1, que estabiliza la colagenasa y es adecuado para el proceso de purificación posterior.
- 50 Se llevan a cabo las siguientes pruebas de control en la solución obtenida en la etapa C: pH; actividad enzimática; concentración de proteína; SDS-PAGE.
- 55 Etapa D: la solución que contiene la colagenasa derivada de la etapa C se somete a la primera purificación cromatográfica con resina de intercambio aniónico que porta grupos dietilaminoalquilo, preferiblemente dietilaminoetilo, tal como DE-52 (dietilaminoetil celulosa DEAE, Whatman). Estas resinas portan grupos básicos débiles y por lo tanto tienen un grado de ionización que depende del pH, con un intervalo estrecho gama de valores de pH entre 6,9 y 7,4, preferiblemente 7,1.
- 60 La solución que contiene la colagenasa derivada de la etapa C se carga en una columna (Pall Chromatography Column Resolute Mod. 400-V-EP7040) empacada con resina DE-52. Las corridas cromatográficas se controlan mediante un detector UV-vis a 280 nm.
- 65 Antes de cargar la columna se equilibra con el mismo regulador, en adelante denominado "regulador de equilibrio" (TRIS-HCl 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 7,1), en el que se dializó la colagenasa durante la etapa C. Después de la carga, se eluye la resina con la colagenasa enlazada con dicho regulador de equilibrio, para eliminar las

proteínas no unidas a la resina. Se lleva a cabo un segundo lavado con un regulador con mayor conductividad, en adelante denominado "regulador de lavado" (TRIS-HCl 300 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1), para eliminar las impurezas de bajo peso molecular. La colagenasa unida a la resina se eluye aumentando aún más la conductividad con un tercer regulador llamado el "regulador de elución" (Tris-HCl 300 mM, NaCl 700 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1).

Etapa E: las fracciones recogidas durante la elución que presentan actividad colagenolítica y exhiben buena pureza en SDS-PAGE se combinan y se transfieren al sistema de ultrafiltración con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferiblemente de 30 kD, que se concentra y dializa en un regulador que estabiliza la colagenasa y es adecuado para el proceso de purificación posterior.

Las siguientes pruebas de control se llevan a cabo en la solución obtenida en la Etapa E: pH; actividad enzimática; concentración de proteína; SDS-PAGE; ensayo de caseinasa.

Etapa F: la solución procedente de la etapa E pasa a la segunda etapa de purificación con cromatografía de intercambio aniónico usando una resina que porta grupos intercambiadores básicos formados por amonio cuaternario, tales como Source<sup>MR</sup> 15Q (GE Healthcare). Las corridas cromatográficas se controlan mediante un detector UV-vis a 280 nm.

Antes de la carga, la columna (Millipore GS 70-550) empacada con resina Source<sup>MR</sup> 15Q se equilibra con el mismo regulador en el que se dializa la colagenasa durante la etapa E (regulador de equilibrio).

La solución que contiene la colagenasa procedente de la etapa E se carga en la columna, y se eluye la resina con el colagenasa unida con el regulador de equilibrado para eliminar las proteínas no unidas. La colagenasa unida a la resina se eluye aumentando aún más la conductividad con un segundo regulador (regulador de elución TRIS-HCl 2-300 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1).

Etapa G: las fracciones recogidas durante la elución que presentan actividad colagenolítica y que presentan una pureza  $\geq 95\%$  en SDS-PAGE se combinan y se transfieren al sistema de ultrafiltración con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferentemente de 30 kD, para ser concentradas y dializadas en un regulador que estabiliza la colagenasa.

Se llevan a cabo las siguientes pruebas de control en la solución obtenida en la Etapa G: pH; actividad enzimática; concentración de proteína; SDS-PAGE.

Etapa H: la solución de colagenasa procedente de la etapa G se diluye en regulador de estabilización y se filtra a través de un filtro absoluto de 0,2  $\mu\text{m}$ . La solución estéril obtenida de este modo es el producto final del proceso de purificación y se analiza para las siguientes características:

- concentración de proteína
- actividad enzimática
- pH
- ensayo de caseinasa
- pureza en SDS
- dímero y análisis de alto peso molecular con UPLC SEC
- endotoxinas
- pruebas de esterilidad

Métodos de análisis

Determinación espectrofotométrica de la actividad enzimática de la colagenasa (Wunsch, E., y Heidrich, H. G., modificado)

El presente método permite determinar la actividad de la colagenasa presente en las soluciones acuosas. La actividad se expresa en katalas, definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato en 1 segundo bajo las condiciones especificadas por el método. La cantidad de enzima que cataliza la transformación del sustrato en un tiempo preestablecido a 37° C y pH 7,1, en relación con la cantidad de solución analizada, se expresa en nkat/ml. El principio del método se basa en la reacción entre la colagenasa y el sustrato sintético PZ-L-prolil-L-leucil-glicil-L-prolil-D-arginina (donde PZ = 4-fenilazobenciloxycarbonilo) específico para la colagenasa. Después de reaccionar con la colagenasa, se escinde el sustrato sintético en 2 fragmentos, PZ-L-prolil-L-leucilo y glicil-L-prolil-D-arginina. El segundo fragmento es incoloro, mientras que el primero es un cromóforo y se puede determinar espectrofotométricamente después de la extracción con una solución orgánica de acetato de etilo acidificado con ácido cítrico. La absorbancia del fragmento en 320 nm es proporcional a la actividad de la enzima.

Para realizar el ensayo enzimático es necesario preparar una serie de diluciones de la muestra con el fin de tener una concentración enzimática que cae en el rango de linealidad del método.

La muestra a analizar se diluye en Tris 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,1 regulador; se hacen reaccionar 0,5 ml de esta solución regulada a 37° C durante 15 min con 2 ml de una solución 1,23 mM de sustrato sintético. Al final de la reacción

enzimática, se extraen 0,5 ml de la mezcla de reacción con la fase orgánica con una mezcla de 5:1 de acetato de etilo y ácido cítrico al 0,5%, pH 3,5. Se remueve la fase orgánica y se deshidrata mediante la adición de 300 mg de sulfato de sodio anhidro. Se analiza la fase orgánica deshidratada espectrofotométricamente a 320 nm frente a acetato de etilo. Los resultados de la actividad enzimática, expresados en nkat/ml, se calculan con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad nkat / ml} = \frac{(\text{Abs}_{320} \text{ muestra} - \text{Abs}_{320} \text{ blanco}) \times \text{Conc. estándar} (\mu\text{moles / ml})}{\text{Abs}_{320} \text{ estándar} - \text{Abs}_{320} \text{ blanco}} \times \frac{50 \times 1000}{900} \times \text{fd}$$

1000 = factor de conversión de  $\mu\text{mol}$  a  $\text{nmol}$

900 = segundos en 15 minutos

fd = factor de conversión para la dilución inicial de la solución de colagenasa

50 = factor de conversión para la dilución de la muestra (0,5 ml y se diluye hasta 2,5 ml. 0,5 ml y se diluye hasta 5 ml)

Conc. estándar ( $\mu\text{mol/ml}$ ) = 0,02 = 0,4 ml de la solución 250  $\mu\text{M}$  diluida hasta 5 ml.

Se administra el blanco mediante la misma reacción enzimática como colagenasa en donde la solución que contiene la enzima se reemplaza con el regulador de referencia (Tris 25 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, pH 7,1).

El estándar es una solución 0,2504 mM del fragmento de reacción PZ-L-prolil-L-leucina en acetato de etilo.

Se añaden 0,4 ml de esta solución a una solución que consiste en 4,6 ml de acetato de etilo y 1 ml de ácido cítrico al 0,5%, pH 3,5. Se separa la fase orgánica y se deshidrata mediante la adición de 300 mg de sulfato de sodio anhidro. La fase orgánica deshidratada se analiza espectrofotométricamente a 320 nm frente a acetato de etilo.

Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry

La concentración de proteína de soluciones que contienen colagenasa se determina por el método de Lowry acuerdo con las siguientes referencias:

1. Farmacopea Europea 5.0, proteína total, Capítulo 2.5.33;

2. Lowry, O.H. y colaboradores, 1951, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", J. Biol. Chem., 193, 265-275.

UPLC de exclusión por tamaño

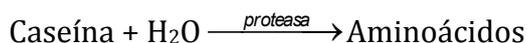
Se utiliza análisis de exclusión por tamaño de UPLC para determinar los dímeros y moléculas con alto peso molecular (definidos como impurezas) y/o productos de degradación de la colagenasa. El instrumento utilizado es un Acquity UPLC H-Class con detector PDA eñ equipado con una columna Acquity UPLC BEH 200 SEC. El análisis se llevó realizó en el modo isocrático utilizando un regulador de fosfato de pH 6,4 - 6,7 formulado como sigue:  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  8,9 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6,9 g/l y NaCl 8,76 g/l. Se filtró el regulador a través de filtros absolutos de 0,2  $\mu\text{m}$  antes del uso. Se inyectan 1,5-4  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 5  $\mu\text{l}$  para cada prueba.

Electroforesis SDS-PAGE

El análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) se lleva a cabo de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli, Reino Unido, 1970, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature, 227, 680-685).

Determinación de caseinasa

La determinación de la caseinasa se utiliza como método para analizar las proteasas no específicas presentes como impurezas en la solución de colagenasa. El método de análisis se realiza de acuerdo con Anson, M.L. (1938) J. Gen. Physiol. 22, 79-89, y Folin, O. y Ciocalteu, V. (1927) J. Biol. Chem. 73,627-650. La caseinasa se determina usando caseína como sustrato. La reacción se puede ilustrar esquemáticamente como sigue:



La cantidad de tirosina producida por la reacción se determina colorimétricamente mediante la explotación de la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que tiene la propiedad de oxidar la tirosina en un ambiente alcalino de manera que se desarrolla un color azul. En resumen, se añade 1 ml de solución que se va a analizar a 5 ml de solución de caseína al 0,65% (p/v) y se dejó reaccionar durante 30 minutos a 37° C. Se añaden 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al final de la incubación, y se filtra la muestra a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  después de 2 minutos. Se recoge el filtrado; se añaden 5 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M y 1 ml de Folin-Ciocalteu 0,5 N y se deja reaccionar la mezcla durante 30 minutos a 37° C. Al final de la reacción, se filtra la muestra adicionalmente a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  y se analiza el filtrado con el espectrofotómetro, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. Al mismo tiempo, se

preparan el blanco y la línea de calibración con una solución de L-tirosina 1,1 mM como estándar.

Los resultados se calculan con la siguiente fórmula:

$$5 \quad \frac{\text{Unidad}}{\text{ml}} = \frac{(\text{DO}_{\text{muestra}} - \text{DO}_{\text{blanco}}) - c}{m} \times 10 \times 6,5 \times 8 \times fd$$

c = término conocido

m = coeficiente angular

10 = factor de conversión de 30 minutos a 5 horas

10 6,5 = volumen total en ml de solución de detención

8 = volumen total de solución colorimétrica

1 = ml de muestra de colagenasa

2 = ml de la muestra utilizada para el desarrollo del color

15

fd = factor de dilución

Medición de la densidad óptica  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$

20 Este método permite el crecimiento de las células durante las diversas etapas del proceso de producción a evaluar, a partir del matraz Erlenmeyer de 5 litros hasta el biorreactor 1000 litros. Para realizar la medición de la  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ , se toma 1 ml de suspensión de células y se centrifuga a 12000 rcf durante 5 min, se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, después de lo cual se lee la absorbancia a 600 nm.

Ensayo de endotoxina

25 El ensayo de endotoxina en la solución final de colagenasa se realizó como se describe en la Farmacopea Europea, Ensayo de Endotoxina, capítulo 2.6.14.

Determinación de la actividad enzimática de la colagenasa por UPLC

30 El presente método permite cuantificar la actividad de la colagenasa por análisis UPLC. El método se basa en la cuantificación del fragmento producido por la reacción enzimática (de acuerdo con el método de Wunsch) contra el estándar externo.

35 La cantidad de enzima que cataliza la transformación del sustrato en un tiempo predeterminado a  $37^\circ \text{C}$  y pH 7,1, en relación con la cantidad de solución analizada, se expresa en nkat/ml. La actividad se expresa en katal, definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato en 1 s bajo las condiciones especificadas por el método.

40 El intervalo de uso del método en condiciones lineales se extiende hasta aprox. 10,2 nkat/ml, como la actividad máxima de la colagenasa en solución que puede ser analizada de acuerdo con la metodología descrita, sin necesidad de realizar "diluciones".

45 La solución acuosa de la colagenasa se hace reaccionar con el sustrato sintético PZ-L-prolil-L-leucil-glicil-L-prolil-D-arginina (donde PZ = 4-fenilazobenciloxycarbonilo). Se liberan dos fragmentos bajo condiciones controladas (pH, temperatura, tiempo): PZ-L-prolil-L-leucina; glicil- L-prolil-D-arginina. El segundo fragmento se determina por UPLC.

Los parámetros de funcionamiento del sistema de UPLC son:

- 50
- velocidad de flujo: 0,919 ml/min
  - duración de la prueba: 3 minutos
  - longitud de onda: 320 nm
  - volumen de inyección: 1,4  $\mu\text{l}$
  - temperatura de la columna:  $25^\circ \text{C}$

| tiempo (minutos) | Ácido cítrico al 0,5% p/v pH 3,5 | Acetonitrilo |
|------------------|----------------------------------|--------------|
| 0                | 50                               | 50           |
| 1,17             | 50                               | 50           |
| 0,34             | 10                               | 90           |
| 1,13             | 10                               | 90           |

55

Bajo estas condiciones el sustrato eluye después de aproximadamente 0,25 minutos y el fragmento después de aprox.

0,44 minutos.

La determinación de la actividad de la enzima consta de los siguientes pasos:

- 5 I. Preparación de TRIS-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, solución reguladora pH 7,1 (Reactivo A).  
 II. Preparación de una solución de ácido cítrico al 0,5% (Reactivo B).  
 III. Preparación de una solución de sustrato 1,23 mM (Reactivo C).  
 IV. Preparación de la solución de PZ-L-prolil-L-leucina 200 μM en acetonitrilo (Reactivo E).  
 10 V. Preparación de la solución de colagenasa que se va a analizar (solución D). La solución enzimática se diluye en un matraz volumétrico con la solución reguladora (Reactivo A), para obtener una solución con una actividad de menos de 1,2 nkat/ml.  
 VI. Reacción enzimática. Se pipetea 2 ml de reactivo C y 0,5 ml de la solución D en un tubo de ensayo con tapa rosca usando una pipeta de vidrio. La mezcla se deja reaccionar durante 15 min a 37° C en un baño termostático. Al final de la reacción, esta se llama solución Y. Se prepara un "blanco", W, en forma paralela de la siguiente manera: 2 ml de reactivo C y 0,5 ml de solución reguladora (reactivo A). Se deja reaccionar la mezcla durante 15 min a 37° C en un baño termostático.  
 15 VII. Las muestras se preparan tomando 0,5 ml de solución Y e introduciéndolos en un matraz de 10 ml que contiene 2,0 ml de ácido cítrico al 0,5%, y se completó hasta el volumen final con acetonitrilo.  
 VIII. La solución de referencia se prepara mediante la introducción de 0,5 ml de blanco W, 2,0 ml de ácido cítrico y 1,5 ml de reactivo E en un matraz de 10 ml, y se lleva hasta el volumen final con acetonitrilo.  
 IX. Se inyectan 1,4 μl de la solución de referencia seguido de 1,4 μl de la solución que se va a analizar.

Los resultados de la actividad de la enzima expresados en nkat/ml se calculan con la siguiente fórmula:

25 
$$\text{Actividad nkat/ml} = \frac{\text{Área de la muestra} \times \text{Conc. estándar} (\mu\text{moles/ml})}{\text{Área estándar}} \times \frac{1000 \times 100}{900} \times fd$$

Cálculo de la actividad enzimática = nanomoles por segundo por ml de solución (nkat/ml), donde:

- 30 1000 = factor de conversión de micromoles a nanomoles  
 100 = factor de conversión para la dilución de la muestra (0,5 ml a 2,5 ml. 0,5 ml a 10 ml)  
 900 = segundos en 15 minutos  
 Conc. estándar (μmoles/ml) = 0,03 (1,5 ml de la solución 200 μM a 10 ml)  
 fd = factor de dilución de la solución de colagenasa utilizada para preparar la solución D

35 Caracterización de proteína

Determinación de la secuencia del terminal N

- 40 La secuencia de aminoácidos del terminal N de la colagenasa procedente de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* se determinó por el método de degradación de Edman utilizando un secuenciador automatizado de proteínas en fase líquida (ABI-Perkin Elmer modelo 477°). La secuencia obtenida se verificó mediante análisis bioinformático, corriendo búsquedas por BLAST (Basic Logical Alignment Search Tool) de la secuencia contra la base de datos del GenBank.

45 Análisis del mapeo de péptidos

- Para analizar el mapa de péptidos, se reduce primero la colagenasa con DTT, se alquila con yodoacetamida y luego se desala usando una columna PD10, eluyendo con ácido acético al 1%. El eluato se somete a digestión trípica y se analizan los fragmentos con MALDI-MS. El espectro global se reporta en (Fig. 1: análisis de la digestión trípica); esto permite establecer que más del 90% de la secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia depositada en la base de datos correspondiente a la colagenasa producida a partir de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus*.

Dicroísmo circular

- 55 Los espectros de dicroísmo circular UV lejano (FUV-CD) se registraron en un polarímetro de espectro Jasco, modelo J-810, conectado a un baño termostático a 25° C. Los espectros se registraron utilizando una cubeta de 0,1 cm a la velocidad de 20 nm/min, con una respuesta cada 8 s, para un promedio de dos acumulaciones. Cada muestra se analizó por duplicado.

- 60 La señal de CD se expresó como la elipticidad por residuo medio, calculado con la fórmula  $[\theta] = \theta_{\text{obs}} \times \text{MRW} / (10 \times 1 \times c)$ , en donde  $\theta_{\text{obs}}$  es la elipticidad observada en mdeg, "MRW" es el peso molecular medio por residuo, "l" es la trayectoria óptica en cm y "c" es la concentración en mg/ml. Las muestras se analizaron a una concentración de 0,2 mg/ml.

Ejemplo 1: Producción y purificación de colagenasa de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus*, en una fermentación de

800 L.

(Fig. 2: Diagrama de flujo del proceso de producción y purificación)

## 5 Fermentación

La fermentación se divide en 2 etapas:

10 Etapa 1: Preparación del inóculo

Etapa 2: Fermentación

15 Etapa 1: El medio de cultivo es líquido, y se compone de una solución de 1,21 g/l de TRIS, 23,4 g/l de NaCl, 0,29 g/l de CaCl<sub>2</sub> y 15 g/l de peptona de origen animal no bovino (porcino, o una mezcla con peptonas de origen porcino y vegetal) disuelto en agua destilada (Millipore milliQ). El pH del medio se ajustó a 7,1 con HCl y se esteriliza en el autoclave a una temperatura de  $\geq 122^\circ\text{C}$  durante 30 min. Se inocula una ampolla de 1,5 ml de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* (WCB-Working Cell Bank) en un matraz Erlenmeyer de 5 L que contiene 2 L de medio de cultivo y se incuba a  $30^\circ\text{C}$  con agitación a aprox. 150 rpm, durante un tiempo en el intervalo entre 8 y 16 horas. Cuando la DO<sub>600 nm</sub> alcanza un valor entre 1 y 4, el inóculo está listo para ser transferido al fermentador.

20 Etapa 2: el medio de cultivo es el mismo que el utilizado para la etapa 1, con la adición de 0,25 g/l de antiespumante Sigma 204, se esterilizado a  $\geq 122^\circ\text{C}$  durante 30 min en el fermentador. Se transfieren los 2 L del inóculo mediante un procedimiento estéril al fermentador que contiene 800 L de caldo de fermentación, y se establecen los parámetros de fermentación de la siguiente manera:

25 - temperatura de  $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ,

- agitación 50-150 rpm,

- aire 10-80 Nm<sup>3</sup>/h,

- oxígeno disuelto > 50%,

- pH  $7,1 \pm 0,1$ ,

30 - presión 0-0,4 bar.

Una fermentación típica tiene una duración de 14-20 horas, normalmente 16 horas, lo que corresponde al nivel más alto de actividad de la enzima colagenasa durante todo el proceso de fermentación. Durante la fermentación, se toman muestras mediante un procedimiento estéril para comprobar la pureza del cultivo, la DO<sub>600 nm</sub> y la actividad enzimática. La actividad de la colagenasa se determina espectrofotométricamente por el método de Wunsch-Heidrich modificado (Wunsch, E. & Heidrich, H. G. 1963).

40 Cuando la actividad de la enzima es  $\geq 25.000$  nkat/litro, se termina la fermentación y se añade CaCl<sub>2</sub>, hasta una concentración final de 1,47 g/l, para estabilizar la enzima. Se disminuye la temperatura hasta aprox.  $8^\circ\text{C}$ , y se deja la mezcla bajo agitación durante aprox. 10-30 minutos. Típicamente, un caldo fermentado tiene las siguientes características:

45 1) Actividad enzimática entre 25.000 y 50.000 nkat/litro

2) DO<sub>600 nm</sub> entre 5 y 8

3) Ausencia de contaminantes microbianos

Clarificación: ultrafiltración TFF1 con casetes de MWCO (peso molecular de corte) de 300 kDa

50 El caldo de fermentación, aprox. 800 litros, se transfiere al sistema de ultrafiltración que contiene Holder Sartocoon II (Sartorius) donde se alojan cinco casetes de MWCO de 300kD (Código 3021467907E-SG), cada uno con un área de filtración de 0,5 m<sup>2</sup>. La membrana de filtración está hecha de polietersulfona modificada (PES), cuya característica principal es una baja afinidad por las proteínas, lo que permite > 80% de recuperación y la clarificación del medio con baja pérdida de la colagenasa.

55 El objetivo de ultrafiltración con casetes de 300 kD es remover la masa microbiana del caldo de fermentación y eliminar un agregado de proteína de aprox. 320 KDa.

Diálisis y concentración: ultrafiltración TFF2 con casetes de MWCO de 10 kD

60 Después de la clarificación, se concentra el medio y se dializa en el sistema de ultrafiltración PALL Mod UF-A-P0971 en donde se encuentran seis casetes de MWCO de 10 kD (código 34293012), cada uno con un área de filtración de 0,5 m<sup>2</sup>. La membrana de filtración está hecha de polietersulfona modificada (PES), cuya característica principal es una baja afinidad por las proteínas, lo que permite > 80% de recuperación. La ultrafiltración con casetes de 10 kD permite reducir el volumen 15-25 veces, eliminar contaminantes de bajo peso molecular, y reemplazar el medio de cultivo con TRIS 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, regulador de pH 7,1, que es adecuado para el siguiente proceso de purificación. Después de las ultrafiltraciones, se llevan a cabo los siguientes análisis:

- 1) Actividad enzimática
- 2) Ensayo de proteínas
- 3) SDS-PAGE (Fig. 3: SDS-PAGE de las etapas de ultrafiltración de 300 K y 10 K)

5

Legenda de la Fig. 3

- Carril 1 High Range SigmaMarker<sup>MR</sup>
- Carril 2 10 µl de caldo de fermentación
- Carril 3 20 µl de caldo de fermentación
- Carril 4 10 µl de filtrado TFF 300 K
- Carril 5 20 µl de filtrado TFF 300 K
- Carril 6 2 µl de retenido TFF 10 K
- Carril 7 5 µl de retenido TFF 10 K
- Carril 8 16 µl de retenido TFF 10 K
- Carril 9 2 µg FIDIA colagenasa

10

15

Cromatografía aniónica débil (Whatman DE-52)

20

La solución que contiene la colagenasa derivada de los procesos de ultrafiltración es el material de partida para la primera purificación por cromatografía de intercambio aniónico débil usando resina DE-52 (Whatman DEAE: dietilaminoetil celulosa).

25

Las corridas de cromatografía se controlan mediante un detector UV-vis a 280 nm. Típicamente, se cargan 10-25 litros de la solución que contiene colagenasa con una concentración de proteína de 0,8 - 1,2 g/l en la columna (Pall Chromatography Column Resolute Mod. 400-V-EP7040) empacada con 10 Kg de resina DE-52. La cantidad de proteínas totales cargadas en la columna es 0,8 - 3 g/Kg de resina. La resina se equilibra con 10 volúmenes de columna (BV) de TRIS-HCl 25 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1, en adelante denominado "regulador de equilibrio".

30

Después de la carga, se eluye la resina con la colagenasa enlazada con 2-4 BV, generalmente 2, de regulador de equilibrio para eliminar las proteínas no enlazadas a la resina y restaurar los valores de conductividad a aquellos antes de la carga de la muestra.

35

Para eliminar las impurezas de bajo peso molecular, se realiza una elución adicional con 3-5 BV, generalmente 4, de un regulador formulado de la siguiente manera: Tris-HCl 300 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1 (regulador de lavado). Se eluye la colagenasa enlazada a la resina mediante el aumento de la conductividad con 3-5 BV, generalmente 4, de un tercer regulador compuesto de la siguiente manera: Tris-HCl 300 mM, NCl 700 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1 (regulador de elución).

40

La fracción recogida durante la elución con el regulador de elución se somete a un ensayo de actividad enzimática y se analiza con SDS-PAGE.

45

Un perfil típico de cromatografía presenta tres picos distintos, como se muestra en la Fig. 4 (cromatograma típica de DE-52):

50

- el primer (I) (pico eluido con regulador de equilibrio) corresponde a las proteínas no enlazadas, que no presenta ninguna actividad enzimática.
- el segundo pico (II) corresponde a la elución con el regulador de lavado, que presenta actividad colagenolítica pero se descarta debido a numerosas impurezas que también están presentes.
- el tercer pico (III) corresponde a la elución con el regulador de elución, y es el pico con la actividad enzimática más grande y más alta pureza.

55

Típicamente, el pico que contiene colagenasa tiene un volumen de 18-22 litros, y se analiza por las siguientes características:

- 1) Actividad enzimática
- 2) Ensayo de proteína
- 3) SDS-PAGE (Fig. 5)

60

Leyenda de la figura 5

65

- Carril 1 5 µl de la muestra después de TFF2
- Carril 2 20 µl sin enlazar
- Carril 3 10 µl pico I fracción 1
- Carril 4 10 µl pico I fracción 2
- Carril 5 10 µl pico II fracción 1

Carril 6 10 µl pico II fracción 2  
 Carril 7 10 µl pico III

Diálisis y concentración: Ultrafiltración TFF3 con casetes de MWCO de 30 kD

La fracción correspondiente al tercer pico cromatográfico se concentra y se dializa en el sistema de ultrafiltración Cogent<sup>MR</sup> (Millipore) en el que se encuentran dos casetes de MWCO de 30 k (Código 31158044), cada uno con un área de filtración de 0,1 m<sup>2</sup>. La membrana de filtración está hecha de polietersulfona (PES) cuya característica principal es una baja afinidad por las proteínas, lo que permite la recuperación de > 95%. La ultrafiltración con casetes de 30 kD permite que el volumen se reduzca 3-6 veces y el regulador de elución de DE-52 es reemplazado con TRIS 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, regulador pH 7,1, que es adecuado para el proceso de purificación posterior. Se llevan a cabo los siguientes controles en el ultrafiltrado:

- 1) Actividad enzimática
- 2) Ensayo de proteína

Cromatografía aniónica fuerte (Source<sup>MR</sup> 15Q GE Healthcare).

La solución de colagenasa procedente de TFF3 es el material de partida para la segunda purificación por cromatografía de intercambio aniónico fuerte usando resina Source<sup>MR</sup> 15Q (GE Healthcare). Las corridas de cromatografía se controlan mediante un detector UV-vis a 280 nm. Típicamente, se cargan 3-6 litros de solución que contienen colagenasa con una concentración de proteína de 0,8 - 1,2 mg/ml en una columna (Millipore GBP 70-550) empacada con 100 a 200 ml de resina Source<sup>MR</sup> 15Q; la cantidad de proteínas totales cargadas en la columna asciende a 24 - 36 mg/ml de resina. Antes de la carga, la resina se equilibra con 2 volúmenes de columna (BV) de TRIS-HCl 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1, llamado el "regulador de equilibrio".

Después de la carga, la resina con la colagenasa enlazada se eluye con 5-7 BV de regulador de equilibrado para eliminar las proteínas no enlazadas y restaurar la conductividad a los valores iniciales. La colagenasa enlazada a la resina se eluye con 5 - 10 BV de Tris-HCl 300 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7,1 (regulador de elución). El la fracción que contiene colagenasa se eluye en un solo pico, típicamente de 1-2 litros, que se puede ver en el cromatograma mostrado en la Fig. 6 (Cromatograma típico de Source<sup>MR</sup> 15Q).

La fracción que contiene la colagenasa recogida durante la elución se somete a los siguientes controles:

- 1) Actividad enzimática
- 2) Ensayo de proteína
- 3) SDS-PAGE (Fig. 7: SDS-PAGE de las fracciones Source<sup>MR</sup> 15Q)

Leyenda de la Figura 7:

Carril 1 20 µl conc. 20X sin enlazar  
 Carril 2 10 µl Fracción 1  
 Carril 3 10 µl Fracción 2  
 Carril 4 LMW

Diálisis y concentración: Ultrafiltración TFF4 con casetes de MWCO de 30 kD

La fracción que contiene colagenasa se transfiere al sistema de ultrafiltración Cogent<sup>MR</sup> (Millipore) en el que se encuentran dos casetes de MWCO de 30 kD con membrana de polietersulfona (PES), cada uno con un área de filtración 0,1 m<sup>2</sup>. Esta etapa de ultrafiltración permite dializar la muestra y concentrarla contra el TRIS-HCl 25 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM, regulador pH 7,1.

Filtración y almacenamiento

La solución procedente de TFF4 se filtra a través de filtros absolutos de 0,2 µm de polietersulfona (PES) para la esterilización final del producto. El producto final se almacena en contenedores específicos a -20° C.

La solución de colagenasa así obtenida se analizó por las siguientes características: concentración de proteína; actividad enzimática; pH; ensayo específico de proteasa; pureza por SDS-PAGE (Fig. 8: SDS-PAGE del producto final); pureza por UPLC SEC (dímero y análisis de alto peso molecular); ensayo LAL para la determinación de endotoxinas (de acuerdo con la Farmacopea Europea, el producto debe contener no más de 5 UI / kg / hora).

Leyenda de la Figura 8:

Carril 1 HMW  
 Carril 2 Colagenasa Fidia 0,5 µg/carril

Carril 3 Colagenasa Fidia 1 µg/carril  
Carril 4 Colagenasa Fidia 2 µg/carril

Las características específicas se resumen en la tabla a continuación.

Tabla

| Ensayo                                       | Especificaciones  |
|--|---|
| Identificación: UPLC de exclusión por tamaño | - positiva  |
| Apariencia                                   | Clara, solución incolora en TRIS-HCl 25 mM, CaCl <sub>2</sub> 10 mM, pH 7,1 |
| pH de la solución                            | 7,1 ± 0,2   |
| Concentración de proteína                    | ≤1,0 mg/ml de solución  |
| Actividad específica                         | 1000 - 1800 nkat/mg   |
| Actividad de caseína                         | < 1,0 U/ml  |
| Pureza en UPLC                               | 98,0 - 100%   |
| Pureza de la identificación en SDS-PAGE      | Peso molecular 82 KDa 98,0 - 100%   |
| Endotoxinas                                  | Ausentes o de conformidad con la Farmacopea Europea                         |

La colagenasa producida y purificada de acuerdo con la presente invención ha sido probada por el solicitante para verificar las características siguientes, con los resultados que se exponen a continuación:

- puro: tiene una pureza de entre 98 y 100%;
- libre de contaminantes microbianos y de proteínas (endotoxinas, ADN);
- estable a un pH de entre 5,5 y 11 (establecida por la prueba enzimática)
- estable en solución acuosa, por ejemplo que comprende Tris-HCl 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,1, a una T de entre 4° y 40° C, particularmente estable a 37° C
- estable en solución acuosa a 4° C durante 30 días;
- estable en solución acuosa a una T de entre -20° C y -80° C durante 24-48 meses
- puede ser liofilizado con excipientes adecuados (descritos a continuación) para obtener un polvo lipofílico estable.

El liofilizado de colagenasa, que es un objeto adicional de la presente invención, se prepara con excipientes particularmente adecuados para mantener su estabilidad, y puede contener preferiblemente:

- maltosa: 95-96%, preferiblemente 95,75%;
- sales (tales como TRIS-HCl + CaCl<sub>2</sub>): 1,0 - 1,5%, preferiblemente 1,3%;
- colagenasa: 2,5 - 3,5%, preferiblemente 2,95%, para obtener un polvo liofilizado con actividad enzimática entre 7-20 nkat/mg de polvo.

Las cantidades indicadas anteriormente para liofilizado de colagenasa son porcentajes en peso en comparación con el peso total del liofilizado.

La colagenasa obtenida de acuerdo con el proceso de producción y la purificación es por lo tanto adecuada para la preparación de composiciones farmacéuticas de varios tipos, y está diseñada, como se ha dicho, para el uso en el tratamiento de trastornos caracterizados por la acumulación de colágeno o tratamiento dermatológico de defectos/imperfecciones que se benefician de una reducción en acumulaciones locales de colágeno. Las aplicaciones más frecuentes se refieren al tratamiento tópico y/o local de quemaduras de diferentes grados, escaldaduras, úlceras causadas por postración en cama, úlceras vasculares y úlceras diabéticas; en estos casos, la colagenasa elimina efectivamente la cicatriz, permitiendo así que las células subyacentes viables se activen para el propósito de proceso de reparación. Otras aplicaciones terapéuticas se refieren a celulitis, adherencias postquirúrgicas, cicatrices hipertróficas y queloides; en estas situaciones, la producción anormal de colágeno ha afectado negativamente al proceso normal de reparación, y que pueden beneficiarse de la lisis del colágeno irregularmente acumulado.

Otros trastornos que pueden tratarse con colagenasa son capsulitis adhesiva (hombro congelado), la contractura de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.

La aplicación tópica o sistémica, en particular la aplicación inyectable, puede ser necesaria, dependiendo del trastorno.

En cuanto a las aplicaciones tópicas, la sorprendente estabilidad en solución acuosa de la enzima reivindicada en esta memoria permite a su formulación en vehículos hidrófilos; en particular, se ha encontrado que la colagenasa puede ser formulada con polímeros particulares que se hidratan en contacto con el exudado de la lesión sobre la que se coloca, dando lugar a un gel. En esta situación, la enzima se libera gradualmente y en cantidades más grandes que las obtenidas con los portadores lipofílicos ordinarios utilizados hasta la fecha, produciendo un mejor efecto terapéutico; el número de aplicaciones diarias también se puede reducir, mejorando así el cumplimiento del paciente. La forma farmacéutica tópica preferida en el ámbito de la presente invención es un polvo para espolvorear, cuya preparación industrial no requiere de ningún procesamiento particular y que, en la forma de una preparación farmacéutica, puede ser fácilmente medido, depositado correctamente dentro de los bordes de la lesión, y se almacenan durante largos períodos

de tiempo. El polímero hidrofílico utilizado debe ser capaz de absorber el fluido producido por la herida rápidamente, produciendo un material de gel adherente. Dicho gel debe tener obviamente características de viscosidad que permiten su residencia en el sitio de la herida; un gel excesivamente sólido tiende a vitrificarse, mientras que un gel excesivamente líquido se desliza fuera de la herida, arrastrando el ingrediente activo con él. Además, como la preparación debe ser estéril, es esencial que el polímero seleccionado mantenga sus propiedades reológicas después de la hidratación, incluso después de esterilizado previamente por un medio común (generalmente rayos gamma). Para identificar el polímero más adecuado, el solicitante ha llevado a cabo una serie de pruebas en numerosos polímeros (almidón y derivados, alginatos, derivados de celulosa, alcoholes polivinílicos y derivados, gomas y pectinas), como se describe brevemente en el presente documento. Se creó una película continua de solución salina de 2,5 mm de espesor en una placa de Petri de vidrio con un diámetro de 5 cm, sobre la cual se colocó el polímero en polvo a ser examinado (aprox. 1 g) desde un tamiz de acero con poros de tamaño fijo. Se añadió más líquido, siempre y cuando el polímero, convertido en un gel, fuera capaz de absorberlo, manteniendo una viscosidad tal que no goteara desde la placa cuando se mantuviera en forma verticalmente. Después de evaluar la tasa de absorción del líquido y la transparencia y consistencia del gel obtenido, se decidió que el polímero más adecuado para el propósito de la presente invención es el glicolato de almidón de maíz.

El glicolato de almidón de maíz es un polvo blanco fino capaz de fluir y muy higroscópico, que se utiliza en la fabricación de comprimidos y cápsulas debido a sus propiedades de desintegración, pero nunca se ha utilizado mediante aplicación directa. El glicolato de almidón de maíz tiene un pH de entre 5,5 y 7,5, es decir, similar al del tejido sobre el cual se aplica, y se hincha en agua para hasta 300 veces su volumen.

Además de la enzima colagenasa, el polvo para espolvorear puede contener también un ingrediente activo adicional, que estimula la migración de células a fin de permitir una nueva formación de epitelio más rápida del fondo de la herida, y por tanto un cierre más rápido de la herida. De los diferentes agentes posibles, el ácido hialurónico es particularmente adecuado para estos fines; es un heteropolisacárido que consta de residuos alternantes de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Es un polímero de cadena lineal con un peso molecular que oscila entre 50.000 y  $13 \times 10^6$  Da, dependiendo de la fuente de la que se obtiene y los métodos de preparación utilizados. El HA usado en la presente invención puede derivarse de cualquier fuente, tal como extracción de crestas de gallo (documento EP 138 572 B I), fermentación (de *Streptococcus*), o por biosíntesis (de *Bacillus*), y tiene un peso molecular promedio entre 400 y  $3 \times 10^6$  Da, en particular entre  $1 \times 10^5$  Da y  $1 \times 10^6$  Da, e incluso más particularmente entre 200.000 y 750.000 Da. Preferentemente, el HA utilizado aquí para aplicaciones tópicas tiene un peso molecular promedio (PM) de entre 130 y 230 kDa, preferiblemente entre 145 y 210 kDa, e incluso más preferiblemente entre 160 y 200 kDa; este último en adelante se denominará HA con un PM promedio de 200 kDa. El HA con un peso molecular promedio entre 200 y 1.800 kDa, preferentemente entre 500 y 1.300 kDa, e incluso más preferiblemente entre 750 y 1200 kDa, se utiliza para aplicaciones inyectables. Las referencias al peso molecular promedio se refieren al PM promedio en peso, calculado por el método de la viscosidad intrínseca (Terbojevich y colaboradores, Carbohydr Res, 1986, 363-377).

El HA se encuentra en la naturaleza en geles pericelulares, en la sustancia base del tejido conjuntivo de los vertebrados (de la que es uno de los componentes principales), en el líquido sinovial de las articulaciones, el humor vítreo y el cordón umbilical.

Se ha demostrado que el HA desempeña un papel crucial en el proceso de reparación de los tejidos, tanto en términos estructurales (en la organización de la matriz extracelular y la regulación de su hidratación) y como una sustancia que estimula una amplia gama de procesos en los que está directa e indirectamente implicado (formación de coágulos, actividad fagocítica, proliferación de fibroblastos, neovascularización, formación de nuevo epitelio, etc.) (Weigel P. y colaboradores, J Theoretical Biol, 1986: 219-234; Abatangelo G. y colaboradores, J Surg Res, 1983, 35: 410-416; Goa K. y colaboradores, Drugs, 1994, 47: 536-566). El papel del HA en las preparaciones descritas en el presente documento es no sólo promover la cicatrización de heridas, sino sobre todo para evitar que la colagenasa que se acumula en los bordes de la herida dañen las células sanas vivas que residen allí mediante la prevención de su migración hacia las zonas que necesitan regeneración. Por otra parte, la presencia de HA, que es también un polímero absorbente, ayuda a la formación del gel en el interior de la herida y mejora la liberación, y por lo tanto la actividad de la enzima, de la colagenasa, como se ha demostrado y se ilustrará a continuación.

Las formulaciones identificadas también puede incluir un agente que promueve el deslizamiento de los polvos en la etapa de mezcla; aquellos utilizados más comúnmente incluyen dióxido de silicio coloidal, que opcionalmente puede ser incluido en cantidades que van 0,1 y 3%, preferiblemente entre 0,2 y 1%, como es conocido por la persona experta.

En el ámbito de la presente invención, el solicitante en consecuencia pretende reivindicar composiciones farmacéuticas para uso tópico en forma de polvo para espolvorear, que comprende:

- colagenasa obtenida por el procedimiento descrito anteriormente, en una cantidad equivalente a una actividad entre 2 y 8 nkat/g del producto terminado, preferiblemente 5 nkat/g del producto terminado;
- opcionalmente, HA con un peso molecular promedio en peso que varía entre 130 y 230 kDa, preferiblemente entre 145 y 210 kDa, e incluso más preferiblemente entre 160 y 200 kDa, en una cantidad comprendida entre 0,1 y 5%, preferiblemente entre 0,2 y 2% ;
- opcionalmente, dióxido de silicio coloidal en una cantidad de entre 0,1 y 3%, preferentemente entre 0,2 y 1%;

- glicolato de almidón de maíz, en la cantidad necesaria para completar la composición porcentual.

Las cantidades indicadas anteriormente para el polvo para espolvorear son porcentajes en peso en comparación con el peso total de la composición.

5

A continuación se describirán algunos ejemplos de preparación de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente a modo de ejemplo pero no de limitación.

10

Ejemplo 2: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa, ácido hialurónico (HA) y glicolato de almidón de maíz (Formulación 1).

La colagenasa, en forma lipofílica, se mide de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

15

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Colagenasa                       | equivalente a 5 nkat/g                    |
| HA con un PM promedio de 200 kDa | 0,2 g                                     |
| Glicolato de almidón de maíz     | cantidad suficiente hasta completar 100 g |

20

Se pesa y se introduce aproximadamente la mitad de la cantidad de polímero gelificante en el recipiente; se pesan y se introducen en el recipiente colagenasa y HA, previamente micronizados y tamizados hasta 50 µ. Por último, se pesa la cantidad restante de polímero gelificante y se introduce en el recipiente. La preparación se lleva a cabo mediante la mezcla directa de los polvos en un vial de polietileno con forma de paralelepípedo tapado con una tapa inferior de polietileno y una tapa rosca de polipropileno, con una capacidad suficiente para dejar vacío al menos un 40-50% del espacio de cabeza. El vial, fijado en el brazo de un mezclador tipo V en una posición oblicua (45 grados), gira en forma oblicua alrededor de su eje oblicuo a la velocidad de 50 rpm. Se continúa con la mezcla hasta que esta sea homogénea.

25

Ejemplo 3: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa, ácido hialurónico (HA), glicolato de almidón de maíz y deslizante (Formulación 2).

30

Se miden la colagenasa, en forma lipofílica, de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

35

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Colagenasa                       | equivalente a 5 nkat/g                    |
| HA con un PM promedio de 200 kDa | 0,2 g                                     |
| Dióxido de silicio coloidal      | 0,2 g                                     |
| Glicolato de almidón de maíz     | cantidad suficiente hasta completar 100 g |

40

Se pesa aproximadamente la mitad de la cantidad de polímero gelificante y se introduce en el recipiente; la colagenasa y HA, previamente micronizados y tamizados a 50 µ, se pesan y se introducen en el recipiente. Por último, se pesa la cantidad restante de polímero gelificante y el agente de deslizamiento y se introducen en el recipiente. La preparación se lleva a cabo mediante la mezcla directa de los polvos en un vial de polietileno con forma de paralelepípedo cerrado con una tapa inferior de polietileno y una tapa rosca de polipropileno, con una capacidad suficiente para dejar al menos un 40-50% de espacio de cabeza vacío. El vial, fijado en el brazo de un mezclador en V en una posición oblicua (45 grados), gira en forma oblicua alrededor de su eje menor a la velocidad de 50 rpm. Se continúa la mezcla hasta que ésta sea homogénea.

45

Ejemplo 4: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa, ácido hialurónico (HA), glicolato de almidón de maíz y deslizante (Formulación 3).

50

Se mide la colagenasa, en forma lipofílica, de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

55

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Colagenasa                   | equivalente a 5 nkat/g                    |
| HA de PM promedio 200 kDa    | 0,2 g                                     |
| Dióxido de silicio coloidal  | 1 g                                       |
| Glicolato de almidón de maíz | cantidad suficiente hasta completar 100 g |

Para la preparación, véase el Ejemplo 2.

60

Ejemplo 5: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa y glicolato de almidón de maíz (Formulación 4).

Se mide la colagenasa, en forma lipofílico, de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

65

|            |                        |
|------------|------------------------|
| Colagenasa | equivalente a 5 nkat/g |
|------------|------------------------|

Glicolato de almidón de maíz            cantidad suficiente hasta completar 100 g

Se pesa aproximadamente la mitad de la cantidad de polímero gelificante y se introduce en el recipiente; se pesa la colagenasa y se introduce en el recipiente. Por último, se pesa la cantidad restante de polímero gelificante y se introduce en el recipiente. La preparación se lleva a cabo mediante la mezcla directa de los polvos en un vial de polietileno con forma de paralelepípedo cerrado con una tapa inferior de polietileno y una tapa rosca de polipropileno, con una capacidad suficiente para dejar al menos un 40-50% del espacio de cabeza vacío. El vial, fijado en el brazo de un mezclador en V en una posición oblicua (45 grados), gira de forma oblicua alrededor de su eje menor a una velocidad de 50 rpm. Se continúa la mezcla hasta que ésta sea homogénea.

Ejemplo 6: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa, glicolato de almidón de maíz y deslizante (Formulación 5).

Se mide la colagenasa, en forma lipofílica, de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Colagenasa                   | equivalente a 5 nkat/g                    |
| Dióxido de silicio coloidal  | 0,2 g                                     |
| Glicolato de almidón de maíz | cantidad suficiente hasta completar 100 g |

Se pesa aproximadamente la mitad de la cantidad de polímero gelificante y se introduce en el recipiente; se pesa la colagenasa y se introduce en el recipiente. Por último, se pesa la cantidad restante de polímero gelificante y deslizante y se introduce en el recipiente. La preparación se lleva a cabo mediante la mezcla directa de los polvos en un vial de polietileno con forma de paralelepípedo cerrado con una tapa inferior de polietileno y una tapa rosca de polipropileno, con una capacidad suficiente para dejar al menos un 40-50% del espacio de cabeza vacío. El vial, fijado en el brazo de un mezclador en V en una posición oblicua (45 grados), gira de forma oblicua alrededor de su eje menor a una velocidad de 50 rpm. Se continúa la mezcla hasta que ésta sea homogénea.

Ejemplo 7: preparación de un polvo para espolvorear que contiene colagenasa, glicolato de almidón de maíz y deslizante (Formulación 6).

Se mide la colagenasa, en forma lipofílica, de manera que corresponda a una actividad de 5 nkat/g de producto terminado.

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Colagenasa                   | equivalente a 5 nkat/g                    |
| Dióxido de silicio coloidal  | 1 g                                       |
| Glicolato de almidón de maíz | cantidad suficiente hasta completar 100 g |

Para la preparación, véase el Ejemplo 5.

Como se ha indicado, se evaluaron la reología antes y después de la esterilización de dichos polvos para espolvoreo, y su rendimiento en términos de liberación de colagenasa, después de la hidratación. Este último ensayo se realizó por comparación con un producto estándar (Bionect Start®) que contiene colagenasa en un portador lipofílico.

Evaluación reológica antes y después de la esterilización

Se prepararon las muestras ensayadas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 3, que representan las formulaciones más complejas de aquellas identificadas.

Se hidrató 1 g de la Formulación 1 y la Formulación 3 no estériles con 7 ml de solución salina; se llevó a cabo el mismo procedimiento en 1 g de cada una de las mismas formulaciones previamente esterilizadas con rayos gamma (dosis de 25 kGray). Se analizaron los geles así obtenidos para evaluar los módulos de viscosidad  $G'$  y  $G''$  con un viscosímetro HAAKE modelo Mars II equipado con medición de placa-cono con un de diámetro de 60 mm y un ángulo de  $1^\circ$ ; la medición se realizó a  $20 \pm 0,5^\circ$  C con control de rotación con una rampa de velocidad con aceleración constante de 0 a  $5 \text{ s}^{-1}$  en 8 minutos; la interpolación se realizó a  $1,0 \text{ s}^{-1}$ . Los resultados se ilustran en la gráfica 1 (evaluación reológica antes y después e la esterilización): cada formulación conserva evidentemente sus propiedades reológicas prácticamente sin cambios, incluso después de la esterilización. La formulación 1, sin deslizante, tiene módulos  $G'$  y  $G''$  ligeramente superiores, pero no en un grado estadísticamente significativo. Esto significa que el agente de deslizamiento no tiene ningún efecto sobre la reología, y por tanto si se utiliza o no, depende de las condiciones de funcionamiento. Sin embargo, hay que enfatizar que el polímero seleccionado conserva las características de adherencia y viscosidad identificadas en los ensayos preliminares, que son necesarias para la liberación óptima de la enzima contenida en la formulación.

Evaluación de la actividad colagenolítica

Estos ensayos prueban el comportamiento de las formulaciones con y sin ácido hialurónico en comparación con un

producto comercial de referencia (Bionect Start®) que contiene colagenasa en un portador lipofílico (ungüento) y ácido hialurónico.

5 Ya que el agente de deslizamiento no tiene ningún efecto sobre la actividad enzimática de la colagenasa, se decidió probar las formulaciones 1 (con HA) y 4 (sin HA). La actividad de degradación de la enzima se determina con un ensayo cuantitativo sobre un sustrato comercial estándar (kit de sustrato de la colagenasa cromóforo - Fluka 27669). El método se modificó adecuadamente para permitir probar la formulación en polvo de las muestras examinadas, y la simulación de las condiciones a las que se someten las preparaciones después de la aplicación *in vivo*. El ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato específico de colagenasa: 4-fenilazobenciloxicarbonil-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-OH (componente A).  
10 Dicho sustrato se degrada hasta Pz-Pro-Leu-OH (fragmento de color amarillo-naranja) y H-Gly-Pro-D-Arg-OH en presencia de la enzima colagenasa. El péptido Pz-Pro-Leu-OH es soluble en disolventes orgánicos, y se extrae con acetato de etilo de la mezcla acidificada con ácido cítrico. El exceso de sustrato no degradado permanece en la fase acuosa acidificada. Se determina cuantitativamente Pz-Pro-Leu-OH en acetato de etilo por espectrofotometría mediante lectura a 320 nm.

15 **Materiales y métodos**

Kit de sustrato colagenasa cromóforo - Fluka 27669  
20 Formulación 1  
Formulación 4  
Bionect Start®  
Solución salina  
Regulador TRIS  
25 Ácido cítrico 25 mM  
Acetato de etilo  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro.  
Se realizan 3 pruebas para cada formulación.

30 Etapa 1. se colocan 1,1 ml de solución del sustrato a una concentración de 2,6 mM en un tubo de 1,5 ml Corning Costar SpinX (Sigma, Fig. 9A), como se reporta en el método de ensayo comercial Fluka. Se insertan 100 mg de cada formulación en polvo de colagenasa (formulaciones 1 y 4), que se hidratan con 4 veces su peso en solución salina, en el recipiente que tiene la membrana con una porosidad de 0,22 µm (Fig. 9B). Se sella herméticamente el recipiente con un tapón adecuado para evitar que el polvo se hinche debido a una absorción adicional de líquido durante el experimento. Se coloca el contenedor en el tubo con la solución del sustrato (Fig. 9C). Se sella herméticamente el tubo y se invierte para permitir el contacto entre la solución del sustrato y la membrana del recipiente. La colagenasa y el sustrato pueden cruzar la membrana libremente, mientras que los polvos quedan atrapados en el recipiente. La preparación completa se incubaba a 32° C. Los contenedores son reemplazados como se especifica en el protocolo para simular la aplicación diaria, la aplicación cada dos días y una sola aplicación.

40 Para Bionect Start®, que es un ungüento, se modifica la etapa 1 como se describe a continuación:

Se colocan 0,6 ml de solución del sustrato a una concentración de 1,3 mM en tubos Eppendorf de 1,5 ml (Fig. 10: tubo Eppendorf para la etapa 1 modificada), como se reportó en el método del ensayo comercial Fluka. Las tapas de los tubos Eppendorf se llenan con aproximadamente 250 mg de Bionect Start®, que se coloca en contacto con la solución del sustrato y se incubaba a 32° C. Las tapas se reemplazan como se especifica en el protocolo para simular la aplicación diaria, la aplicación cada dos días y una sola aplicación.

50 Etapa 2: Una vez transcurrido el período de contacto preestablecido, se toman 125 µl de la mezcla del sustrato, tratados como se describe en la Etapa 1, en cada punto fijo de tiempo y se colocan en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se añaden 250 µl de ácido cítrico (25 mM) y 1,25 ml de acetato de etilo a esta solución. Se agita la solución durante 15 segundos y se centrifuga. Se transfiere el acetato de etilo, que contiene el sustrato hidrolizado, a un tubo Eppendorf que contiene Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de la agitación y la centrifugación del tubo de Eppendorf, se transfiere la fase orgánica a un nuevo tubo Eppendorf. El sustrato hidrolizado contenido en la fase orgánica se determina espectrofotométricamente a 320 nm.

55 El análisis de datos se reporta en las Gráficas 2, 3 y 4.

60 Es inmediatamente evidente que las formulaciones en polvo se comportan mucho mejor que el producto de referencia en cada una de las frecuencias de aplicación probadas, y para cada punto de tiempo considerado.

65 En particular, los valores de las Formulaciones 1 y 4 fueron siempre muy significativos en comparación con el producto de referencia, demostrando su mejor eficacia, lo que significa un menor número de aplicaciones para el paciente. En cualquier caso, es evidente que las formulaciones en polvo funcionan mucho mejor que aquellas que contienen colagenasa en un portador lipofílico. Esto significa no sólo que la colagenasa presente en las formulaciones en polvo actúa en el entorno acuoso creado cuando el exudado es absorbido por glicolato de almidón de maíz, lo que demuestra la estabilidad en solución acuosa previamente reivindicada, sino que también funciona sorprendentemente mejor de lo

esperado.

En cuanto a las formulaciones inyectables, como se estableció anteriormente explotan sustancialmente la pureza de la enzima obtenida por el procedimiento descrito anteriormente y su sorprendente estabilidad en un portador acuoso, tanto en un ambiente T como a temperaturas que oscilan entre -20 y -80° C. Las composiciones inyectables se componen preferiblemente de colagenasa en forma liofilizada reconstituida en solución acuosa, preferiblemente en el momento de uso, y comprenden, por dosis unitaria:

- colagenasa obtenida de acuerdo con el proceso descrito, en una cantidad equivalente a la actividad entre 120 y 450 nkat;
- solución salina estéril (NaCl 0,9%);
- opcionalmente, HA con un peso molecular promedio en peso entre 750 y 1.200 kDa, en una concentración que oscila entre 1 y 30 mg/ml de solución salina, preferiblemente entre 8 y 20 mg/ml, y aún más preferiblemente entre 10 y 15 mg/ml.

A continuación se describirán algunos ejemplos de preparación de soluciones inyectables de colagenasa a modo de ejemplo pero no de limitación.

Ejemplo 8: preparación de una solución inyectable de la colagenasa en solución salina estéril (NaCl al 0,9%).

|                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| Colagenasa              | equivalente a 196 nkat |
| Solución salina estéril | 1 ml                   |

La enzima en forma lipofílica, contenida en una ampolla estéril adecuada, se reconstituye con 0,35 ml de solución salina estéril, tomada con una jeringa graduada. Después de agitación suave se obtiene una solución estable.

Ejemplo 9: preparación de una solución inyectable de colagenasa en solución salina estéril (NaCl al 0,9%).

|                         |                        |
|-------------------------|------------------------|
| Colagenasa              | equivalente a 392 nkat |
| Solución salina estéril | 1 ml                   |

La enzima en forma lipofílica, contenida en una ampolla estéril adecuada, se reconstituye con 0,7 ml de solución salina estéril, tomados con una jeringa graduada. Después de agitación suave se obtiene una solución estable.

Ejemplo 10: preparación de una solución inyectable de colagenasa formulada en HA con PM de 750 kDa.

|                |                        |
|----------------|------------------------|
| Colagenasa     | equivalente a 196 nkat |
| Solución de HA | 1 ml                   |

Se reconstituye previamente la solución de HA disolviendo 10 mg de HA previamente micronizado contenida en una ampolla estéril adecuada en 1 ml de solución salina estéril. La enzima en forma liofilizada se reconstituye con 0,35 ml de solución de HA, medidos con una jeringa graduada. Después de agitación suave hasta que se disuelve el polvo de colagenasa, se obtiene una solución estable.

Ejemplo 11: preparación de una solución inyectable de colagenasa formulada en HA de PM de 1200 kDa.

|                |                        |
|----------------|------------------------|
| Colagenasa     | equivalente a 392 nkat |
| Solución de HA | 1 ml                   |

Se reconstituye previamente la solución de HA disolviendo 15 mg de HA previamente micronizado contenida en una ampolla estéril adecuada en 1 ml de solución salina estéril. La enzima en forma liofilizada se reconstituye con 0,7 ml de solución de HA, medidos con una jeringa graduada. Después de agitación suave hasta que se disuelve el polvo de colagenasa, se obtiene una solución estable.

Las soluciones obtenidas de este modo se pueden almacenar a 4° C, aunque es preferible inyectarlas inmediatamente después de la preparación o en un plazo de 8 horas. Además de los usos terapéuticos típicos descritos anteriormente, también se puede utilizar la colagenasa de acuerdo con la invención para disociar tejidos y aislar grupos de células o células individuales, tanto para fines terapéuticos como investigación experimental. Se utiliza esta aplicación, por ejemplo, en el procedimiento de trasplante de células de los islotes de Langerhans para aislar las células de los islotes del tejido pancreático circundante. La colagenasa también se puede utilizar con éxito para aislar células de cardiomiocitos, hepatocitos y tumorales con el propósito de desarrollar la vacuna correspondiente, y en general para todas las células que puedan utilizarse en el campo de la ingeniería genética de tejidos (hueso, cartílago, tiroides, etc.).

Listado de secuencias

<110> Fidia Farmaceutici S.p.A

<120> Nuevo proceso para la producción y purificación de la enzima colagenasa de Vibrio Alginolyticus

<130> 1484PCT

<150> PD2012A000118

<151> 2012-04-18

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 739

<212> PRT

<213> Vibrio alginolyticus

<220>

<221> mat\_péptido

<222> (1)..(739)

<223> Núcleo activo de colagenasa de Vibrio alginolyticus

<400> 1

Thr Ala Cys Asp Leu Glu Ala Leu Val Thr Glu Ser Ser Asn Gln Leu  
1 5 10 15

Ile Ser Glu Ile Leu Ser Gln Gly Ala Thr Cys Val Asn Gln Leu Phe  
20 25 30

Ser Ala Glu Ser Arg Ile Gln Glu Ser Val Phe Ser Ser Asp His Met  
35 40 45

Tyr Asn Ile Ala Lys His Thr Thr Thr Leu Ala Lys Gly Tyr Thr Gly  
50 55 60

Gly Gly Ser Asp Glu Leu Glu Thr Leu Phe Leu Tyr Leu Arg Ala Gly  
65 70 75 80

Tyr Tyr Ala Glu Phe Tyr Asn Asp Asn Ile Ser Phe Ile Glu Trp Val  
85 90 95

Thr Pro Ala Val Lys Glu Ser Val Asp Ala Phe Val Asn Thr Ala Ser  
100 105 110

Phe Tyr Glu Asn Ser Asp Arg His Gly Lys Val Leu Ser Glu Val Ile  
115 120 125

Ile Thr Met Asp Ser Ala Gly Leu Gln His Ala Tyr Leu Pro Gln Val

5

10

15

20

25

ES 2 575 878 T3

|            |     |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |  |
|------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|
| 130        |     |            |            |            |            | 135        |            |            |            |            |            | 140        |            |            |            |  |
| Thr<br>145 | Gln | Trp        | Leu        | Thr        | Arg<br>150 | Trp        | Asn        | Asp        | Gln        | Tyr<br>155 | Ala        | Gln        | His        | Trp        | Tyr<br>160 |  |
| Met        | Arg | Asn        | Ala        | Val<br>165 | Asn        | Gly        | Val        | Phe        | Thr<br>170 | Ile        | Leu        | Phe        | Gly        | Gly<br>175 | Gln        |  |
| Trp        | Asn | Glu        | Gln        | Phe<br>180 | Val        | Gln        | Ile        | Ile<br>185 | Gly        | Asn        | Gln        | Thr        | Asp<br>190 | Leu        | Ala        |  |
| Lys        | Ala | Leu<br>195 | Gly        | Asp        | Phe        | Ala        | Leu<br>200 | Arg        | Ala        | Ser        | Ser        | Ile<br>205 | Gly        | Ala        | Glu        |  |
| Asp<br>210 | Glu | Phe        | Met        | Ala        | Ala        | Asn<br>215 | Ala        | Gly        | Arg        | Glu        | Leu<br>220 | Gly        | Arg        | Leu        | Thr        |  |
| Lys<br>225 | Tyr | Thr        | Gly        | Asn        | Ala<br>230 | Ser        | Ser        | Val        | Val        | Lys<br>235 | Ser        | Gln        | Leu        | Ser        | Arg<br>240 |  |
| Ile        | Phe | Glu        | Gln        | Tyr<br>245 | Glu        | Met        | Tyr        | Gly        | Arg<br>250 | Gly        | Asp        | Ala        | Val        | Trp<br>255 | Leu        |  |
| Ala        | Ala | Ala        | Asp<br>260 | Thr        | Ala        | Ser        | Tyr        | Tyr<br>265 | Ala        | Asp        | Cys        | Ser        | Glu<br>270 | Phe        | Gly        |  |
| Ile        | Cys | Asn<br>275 | Phe        | Glu        | Thr        | Glu        | Leu<br>280 | Lys        | Gly        | Leu        | Val        | Leu<br>285 | Ser        | Gln        | Thr        |  |
| Tyr<br>290 | Thr | Cys        | Ser        | Pro        | Thr        | Ile<br>295 | Arg        | Ile        | Leu        | Ser        | Gln<br>300 | Asn        | Met        | Thr        | Gln        |  |
| Glu<br>305 | Gln | His        | Ala        | Ala        | Ala<br>310 | Cys        | Ser        | Lys        | Met        | Gly<br>315 | Tyr        | Glu        | Glu        | Gly        | Tyr<br>320 |  |
| Phe        | His | Gln        | Ser        | Leu<br>325 | Glu        | Thr        | Gly        | Glu        | Gln<br>330 | Pro        | Val        | Lys        | Asp        | Asp<br>335 | His        |  |
| Asn        | Thr | Gln        | Leu<br>340 | Gln        | Val        | Asn        | Ile        | Phe<br>345 | Asp        | Ser        | Ser        | Thr        | Asp<br>350 | Tyr        | Gly        |  |
| Lys        | Tyr | Ala<br>355 | Gly        | Pro        | Ile        | Phe        | Asp<br>360 | Ile        | Ser        | Thr        | Asp        | Asn<br>365 | Gly        | Gly        | Met        |  |
| Tyr<br>370 | Leu | Glu        | Gly        | Asp        | Pro        | Ser<br>375 | Gln        | Pro        | Gly        | Asn        | Ile<br>380 | Pro        | Asn        | Phe        | Ile        |  |

ES 2 575 878 T3

Ala Tyr Glu Ala Ser Tyr Ala Asn Ala Asp His Phe Val Trp Asn Leu  
385 390 395 400

Glu His Glu Tyr Val His Tyr Leu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Tyr Gly  
405 410 415

Gly Phe Ser His Pro Thr Glu Lys Ile Val Trp Trp Ser Glu Gly Ile  
420 425 430

Ala Glu Tyr Val Ala Gln Glu Asn Asp Asn Gln Ala Ala Leu Glu Thr  
435 440 445

Ile Leu Asp Gly Ser Thr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Phe Glu Thr Thr  
450 455 460

Tyr Asp Gly Phe Asp Val Asp Arg Ile Tyr Arg Trp Gly Tyr Leu Ala  
465 470 475 480

Val Arg Phe Met Phe Glu Asn His Lys Asp Asp Val Asn Gln Met Leu  
485 490 495

Val Glu Thr Arg Gln Gly Asn Trp Ile Asn Tyr Lys Ala Thr Ile Thr  
500 505 510

Gln Trp Ala Asn Leu Tyr Gln Ser Glu Phe Glu Gln Trp Gln Gln Thr  
515 520 525

Leu Val Ser Asn Gly Ala Pro Asn Ala Val Ile Thr Ala Asn Ser Lys  
530 535 540

Gly Lys Val Gly Glu Ser Ile Thr Phe Ser Ser Glu Asn Ser Thr Asp  
545 550 555 560

Pro Asn Gly Lys Ile Val Ser Val Leu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser  
565 570 575

Thr Ser Thr Gln Thr Lys Pro Thr His Gln Tyr Gly Ser Glu Gly Glu  
580 585 590

Tyr Ser Val Ser Leu Ser Val Thr Asp Ser Glu Gly Leu Thr Ala Thr  
595 600 605

Ala Thr His Thr Val Val Ile Ser Ala Leu Gly Gly Asn Asp Thr Leu  
610 615 620

Pro Gln Asp Cys Ala Val Gln Ser Lys Val Ser Gly Gly Arg Leu Thr  
625 630 635 640

ES 2 575 878 T3

Ala Gly Glu Pro Val Cys Leu Ala Asn Gln Gln Thr Ile Trp Leu Ser  
645 650 655

Val Pro Ala Val Asn Glu Ser Ser Asn Leu Ala Ile Thr Thr Gly Asn  
660 665 670

Gly Thr Gly Asn Leu Lys Leu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Trp Pro Asp  
675 680 685

Asp Thr Asn Leu His Gly Trp Ser Asp Asn Ile Gly Asn Gly Glu Cys  
690 695 700

Ile Thr Leu Ser Asn Gln Ser Asn Tyr Trp Gly Tyr Val Lys Val Ser  
705 710 715 720

Gly Asp Phe Glu Asn Ala Ala Ile Val Val Asp Phe Asp Ala Gln Lys  
725 730 735

Cys Arg Gln

<210> 2  
<211> 814  
<212> PRT  
5 <213> Vibrio alginolyticus

<220>  
<221> PÉPTIDO  
10 <222> (1)..(814)  
<223> Colagenasa microbiana EC 3.4.24.3 de Vibrio Alginolyticus

<400> 2

Met Glu Leu Lys Ile Leu Ser Val Ala Ile Ala Thr Thr Leu Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Gly Val Phe Ala Leu Ser Glu Pro Val Ser Gln Val Thr Glu Gln  
20 25 30

His Ala His Ser Ala His Thr His Gly Val Glu Phe Asn Arg Val Glu  
35 40 45

Tyr Gln Pro Thr Ala Thr Leu Pro Ile Gln Pro Ser Lys Ala Thr Arg  
50 55 60

Val Gln Ser Leu Glu Ser Leu Asp Glu Ser Ser Thr Ala Cys Asp Leu  
65 70 75 80

Glu Ala Leu Val Thr Glu Ser Ser Asn Gln Leu Ile Ser Glu Ile Leu

15



ES 2 575 878 T3

Ala Ser Tyr Tyr Ala Asp Cys Ser Glu Phe Gly Ile Cys Asn Phe Glu  
 340 345 350

Thr Glu Leu Lys Gly Leu Val Leu Ser Gln Thr Tyr Thr Cys Ser Pro  
 355 360 365

Thr Ile Arg Ile Leu Ser Gln Asn Met Thr Gln Glu Gln His Ala Ala  
 370 375 380

Ala Cys Ser Lys Met Gly Tyr Glu Glu Gly Tyr Phe His Gln Ser Leu  
 385 390 395 400

Glu Thr Gly Glu Gln Pro Val Lys Asp Asp His Asn Thr Gln Leu Gln  
 405 410 415

Val Asn Ile Phe Asp Ser Ser Thr Asp Tyr Gly Lys Tyr Ala Gly Pro  
 420 425 430

Ile Phe Asp Ile Ser Thr Asp Asn Gly Gly Met Tyr Leu Glu Gly Asp  
 435 440 445

Pro Ser Gln Pro Gly Asn Ile Pro Asn Phe Ile Ala Tyr Glu Ala Ser  
 450 455 460

Tyr Ala Asn Ala Asp His Phe Val Trp Asn Leu Glu His Glu Tyr Val  
 465 470 475 480

His Tyr Leu Asp Gly Arg Phe Asp Leu Tyr Gly Gly Phe Ser His Pro  
 485 490 495

Thr Glu Lys Ile Val Trp Trp Ser Glu Gly Ile Ala Glu Tyr Val Ala  
 500 505 510

Gln Glu Asn Asp Asn Gln Ala Ala Leu Glu Thr Ile Leu Asp Gly Ser  
 515 520 525

Thr Tyr Thr Leu Ser Glu Ile Phe Glu Thr Thr Tyr Asp Gly Phe Asp  
 530 535 540

Val Asp Arg Ile Tyr Arg Trp Gly Tyr Leu Ala Val Arg Phe Met Phe  
 545 550 555 560

Glu Asn His Lys Asp Asp Val Asn Gln Met Leu Val Glu Thr Arg Gln  
 565 570 575

Gly Asn Trp Ile Asn Tyr Lys Ala Thr Ile Thr Gln Trp Ala Asn Leu  
 580 585 590

ES 2 575 878 T3

Tyr Gln Ser Glu Phe Glu Gln Trp Gln Gln Thr Leu Val Ser Asn Gly  
 595 600 605

Ala Pro Asn Ala Val Ile Thr Ala Asn Ser Lys Gly Lys Val Gly Glu  
 610 615 620

Ser Ile Thr Phe Ser Ser Glu Asn Ser Thr Asp Pro Asn Gly Lys Ile  
 625 630 635 640

Val Ser Val Leu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Thr Ser Thr Gln Thr  
 645 650 655

Lys Pro Thr His Gln Tyr Gly Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Val Ser Leu  
 660 665 670

Ser Val Thr Asp Ser Glu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr His Thr Val  
 675 680 685

Val Ile Ser Ala Leu Gly Gly Asn Asp Thr Leu Pro Gln Asp Cys Ala  
 690 695 700

Val Gln Ser Lys Val Ser Gly Gly Arg Leu Thr Ala Gly Glu Pro Val  
 705 710 715 720

Cys Leu Ala Asn Gln Gln Thr Ile Trp Leu Ser Val Pro Ala Val Asn  
 725 730 735

Glu Ser Ser Asn Leu Ala Ile Thr Thr Gly Asn Gly Thr Gly Asn Leu  
 740 745 750

Lys Leu Glu Tyr Ser Asn Ser Gly Trp Pro Asp Asp Thr Asn Leu His  
 755 760 765

Gly Trp Ser Asp Asn Ile Gly Asn Gly Glu Cys Ile Thr Leu Ser Asn  
 770 775 780

Gln Ser Asn Tyr Trp Gly Tyr Val Lys Val Ser Gly Asp Phe Glu Asn  
 785 790 795 800

Ala Ala Ile Val Val Asp Phe Asp Ala Gln Lys Cys Arg Gln  
 805 810



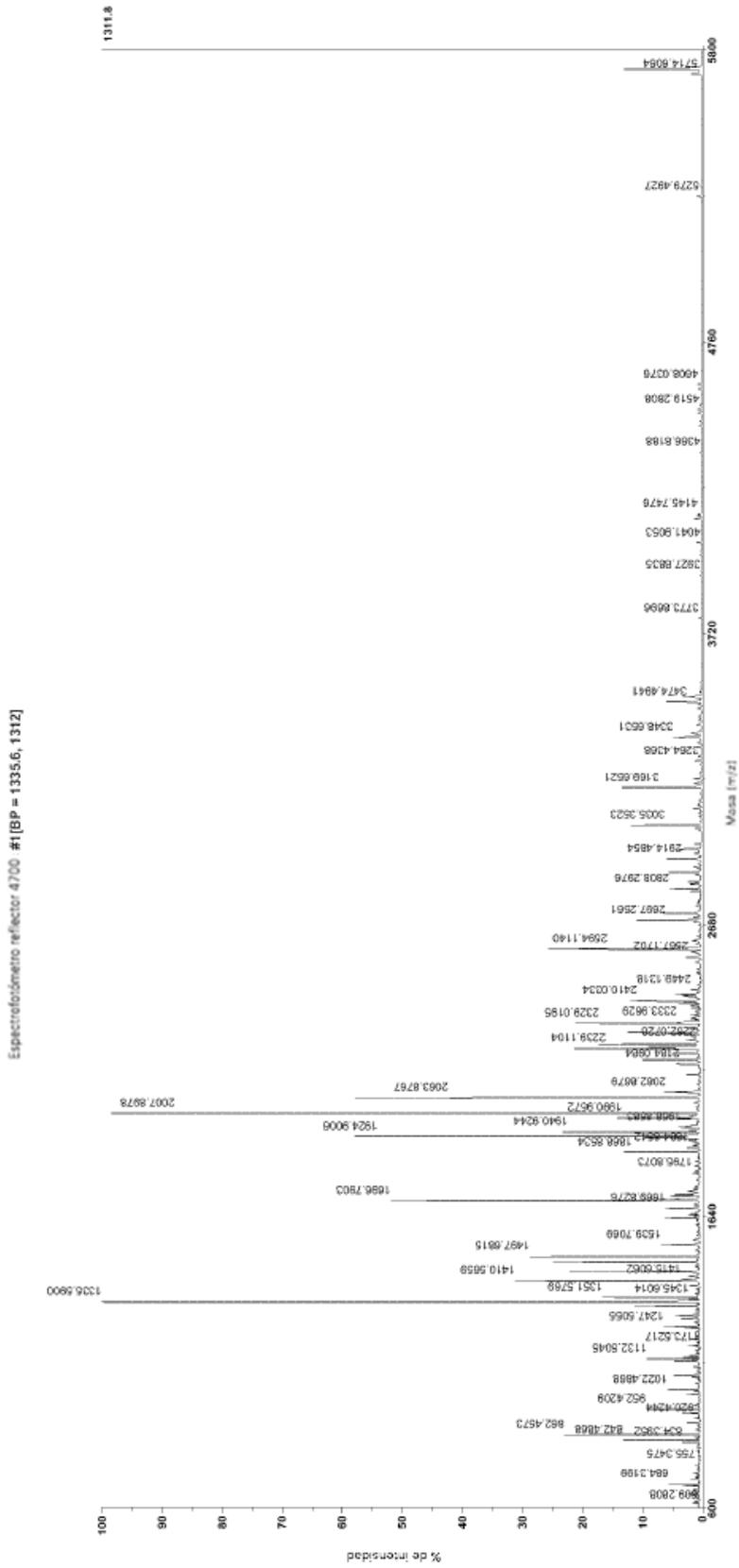
Reivindicaciones

1. Un proceso para la producción y purificación de colagenasa de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus*, que comprende las siguientes etapas:
- 5 Etapa A: La inoculación de *Vibrio alginolyticus* quimiotipo *iophagus* en un matraz Erlenmeyer y la fermentación con caldo de cultivo de origen animal no bovino;
- Etapa B: Clarificación del caldo fermentado así obtenido por ultrafiltración de flujo tangencial (TFF1) con casetes de corte de peso molecular de 100-500 kD (MWCO), preferiblemente de 300 kD;
- Etapa C: Diálisis y concentración del medio clarificado obtenido en la etapa B, por ultrafiltración de flujo tangencial con casetes de MWCO de 5-30 kD, preferentemente MWCO de 10 kD;
- 10 Etapa D: Purificación de la solución que contiene colagenasa obtenida en la Etapa C, por resina de intercambio aniónico que porta grupos básicos débiles, a un pH de entre 6,9 y 7,4, preferiblemente a un pH de 7,1;
- Etapa E: Diálisis y concentración de las fracciones recolectadas que tienen actividad colagenolítica, procedente de la etapa D, por ultrafiltración de flujo tangencial con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferentemente MWCO de 30 kD;
- 15 Etapa F: Purificación de la solución así obtenida, por la resina de intercambio aniónico que porta grupos básicos fuertes, a un pH de entre 6,9 y 7,4, preferiblemente a un pH de 7,1;
- Etapa G: Diafiltración y concentración de las fracciones con actividad colagenolítica  $\geq 95\%$  procedente de la etapa F, por ultrafiltración de flujo tangencial con casetes de MWCO de 10-50 kD, preferentemente MWCO de 30 kD;
- Etapa H: Filtración de la solución que contiene colagenasa obtenida de este modo, a través de un filtro absoluto de 0,2  $\mu\text{m}$ , y almacenamiento a una temperatura de entre  $-20^\circ$  y  $-80^\circ$  C.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el caldo de cultivo es de origen animal porcino o es una mezcla de origen porcino y vegetal.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la resina de intercambio aniónico que porta los grupos básicos débiles porta dietilaminoalquilo, preferiblemente dietilaminoetilo, y la resina de intercambio aniónico que porta grupos básicos fuertes porta grupos de amonio cuaternario.
- 25 4. La colagenasa de *Vibrio Alginolyticus* quimiotipo *iophagus* producida y purificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por:
- peso molecular de 82 kDa;
  - actividad específica entre 1000 y 1800 nkat/mg;
  - pureza entre el 98,0 y el 100%;
- 30 • ausencia de contaminante microbianos y proteicos, específicamente ausencia de endotoxinas y ADN;
- estabilidad a un pH de entre 5,5 y 11;
  - estabilidad en solución acuosa a una T que varía entre  $4^\circ$  y  $40^\circ$  C, particularmente estable a  $37^\circ$  C;
  - estabilidad en solución acuosa a  $4^\circ$  C durante 30 días;
  - estabilidad en solución acuosa a una T que oscila entre  $-20^\circ$  C y  $-80^\circ$  C durante 24-48 meses;
- 35 • capacidad de liofilización para obtener un polvo liofilizado estable.
5. La colagenasa de acuerdo con la reivindicación 4 que es estable en solución acuosa que comprende TRIS-HCl 25 mM y  $\text{CaCl}_2$  10 mM, a pH 7,1.
6. La colagenasa de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 en la forma de un polvo liofilizado estable que tiene actividad enzimática en el intervalo de 7-20 nkat/mg de polvo, que contiene:

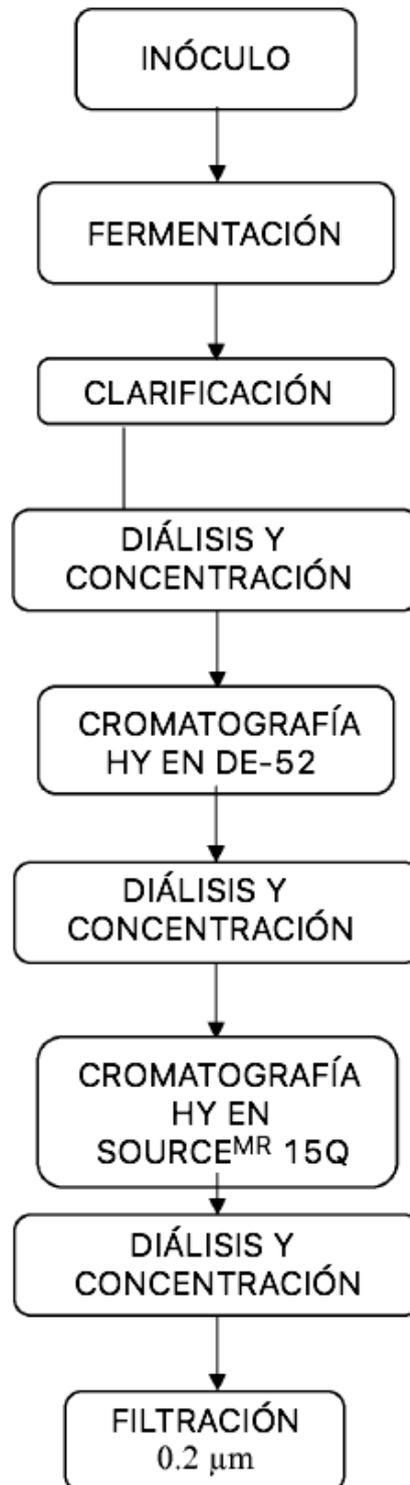
- maltosa: 95-96%, preferiblemente 95,75%;
- sales: 1,0 - 1,5%, preferiblemente 1,3%;
- colagenasa: 2,5 - 3,5%, preferiblemente 2,95%.

- 5 7. La colagenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para el uso en el tratamiento de quemaduras de diferentes grados, escaldaduras por úlceras debidas a postración en cama, úlceras de la piel de diversos orígenes, úlceras vasculares y diabéticas, celulitis, adherencias postquirúrgicas, cicatrices hipertróficas y queloides.
8. La colagenasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, para el uso en el tratamiento de la capsulitis adhesiva, contractura de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.
- 10 9. Una composición farmacéutica para uso tópico, en la forma de polvo para espolvorear, que comprende:
- colagenasa como la reivindicada en la reivindicación 4 o 6, que tiene una actividad en el intervalo entre 2 y 8 nkat/g del producto terminado, preferiblemente 5 nkat/g del producto terminado;
  - glicolato de almidón de maíz, en la cantidad necesaria para completar la composición porcentual;
  - opcionalmente, ácido hialurónico con un peso molecular promedio en peso que varía entre 130 y 230 kDa, preferiblemente entre 145 y 210 kDa, e incluso más preferiblemente entre 160 y 200 kDa, en una cantidad comprendida en el intervalo entre 0,1 y 5%, preferiblemente entre 0,2 y 2%;
  - opcionalmente, dióxido de silicio coloidal en una cantidad en el intervalo entre 0,1 y 3%, preferentemente entre 0,2 y 1%\*.
- 15
10. Una composición farmacéutica inyectable que comprende, por dosis unitaria:
- 20
- colagenasa como la reivindicada en la reivindicación 4 o 6, en una forma liofilizada, que tiene una actividad en el intervalo entre 120 y 450 nkat;
  - solución salina estéril;
  - opcionalmente, ácido hialurónico con un peso molecular promedio en peso en el intervalo entre 750 y 1.200 kDa, en una concentración que oscila entre 15 y 30 mg/ml de solución salina, preferiblemente entre 8 y 20 mg/ml, y aún más preferiblemente entre 10 y 15 mg/ml.
- 25
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para uso en el tratamiento tópico y/o local de quemaduras de diferentes grados, escaldaduras, úlceras por postración en cama, úlceras vasculares y diabéticas, celulitis, adherencias postquirúrgicas, cicatrices hipertróficas y queloides.
- 30 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de capsulitis adhesiva, contractura de Dupuytren, y la enfermedad de Peyronie.

Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 3**

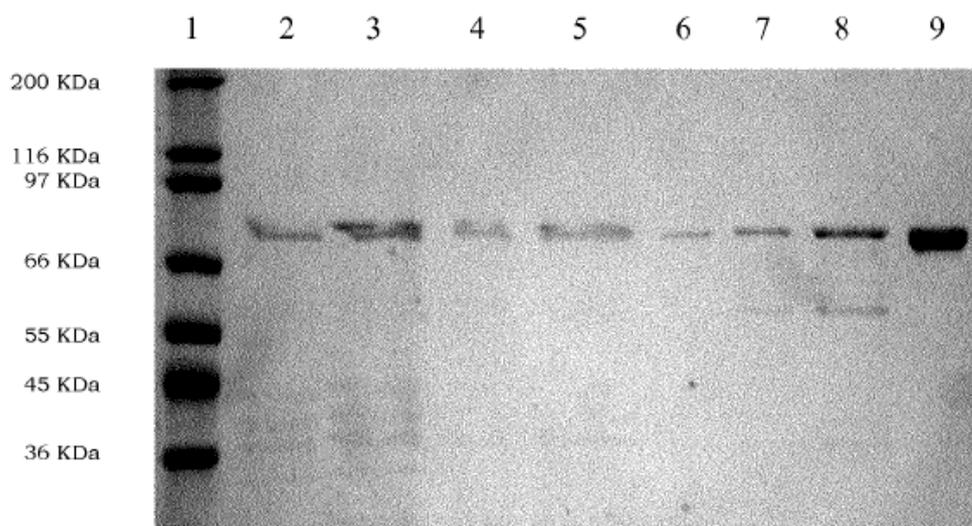
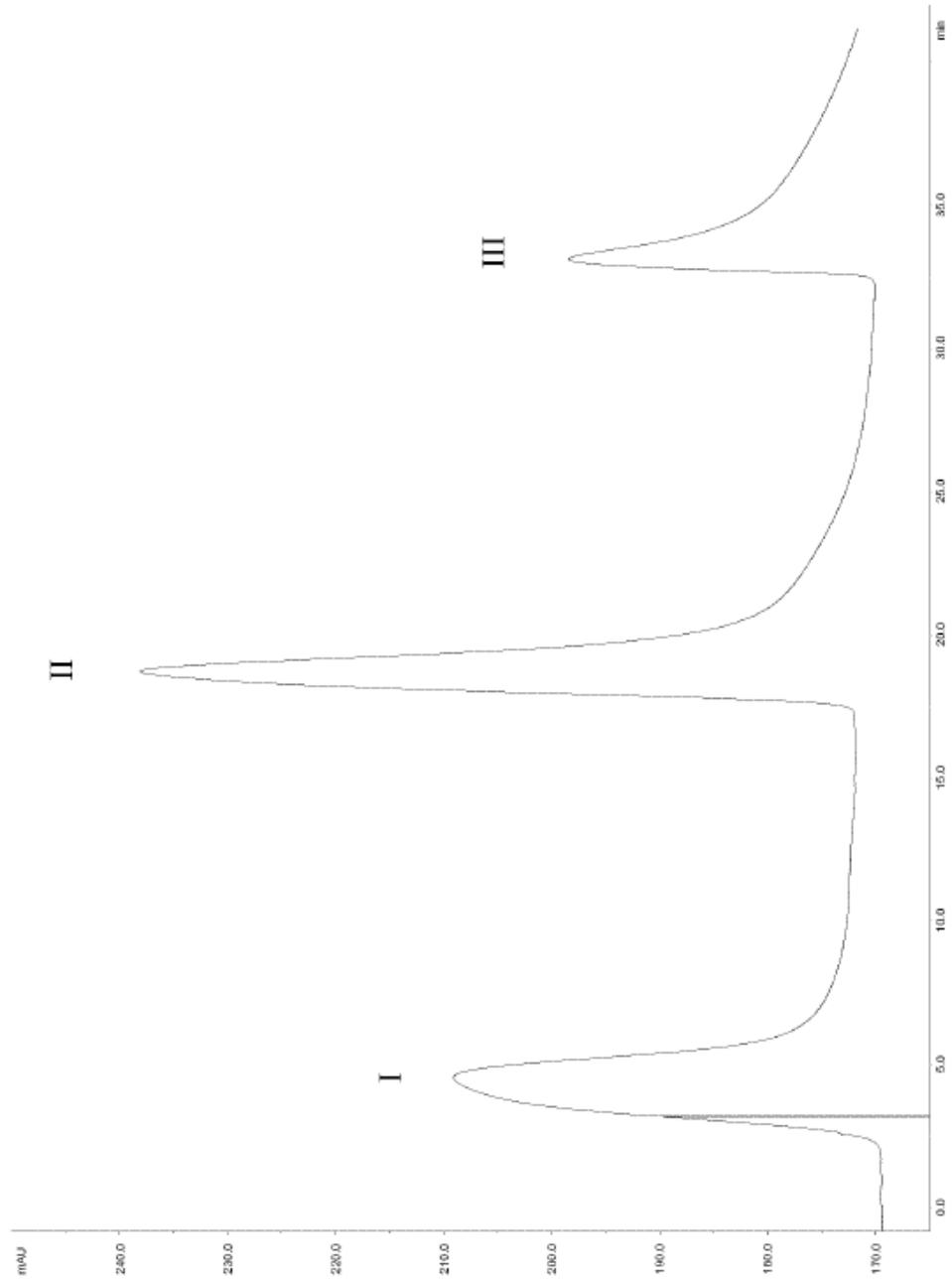


Fig. 4



**Fig. 5**

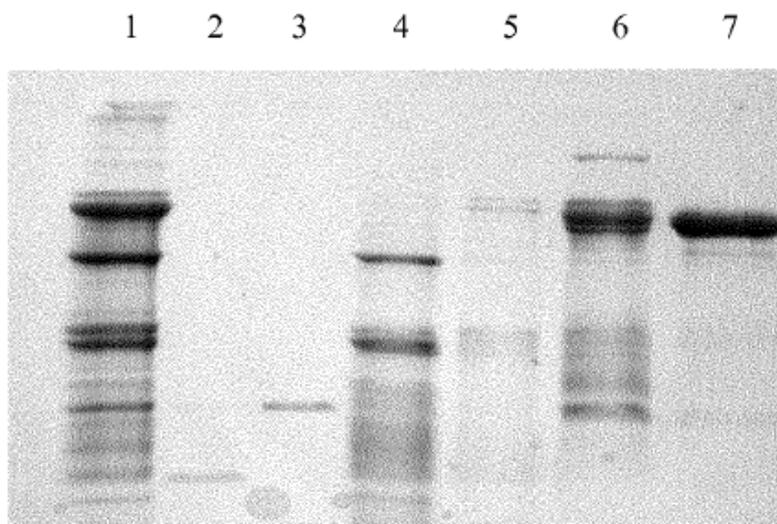
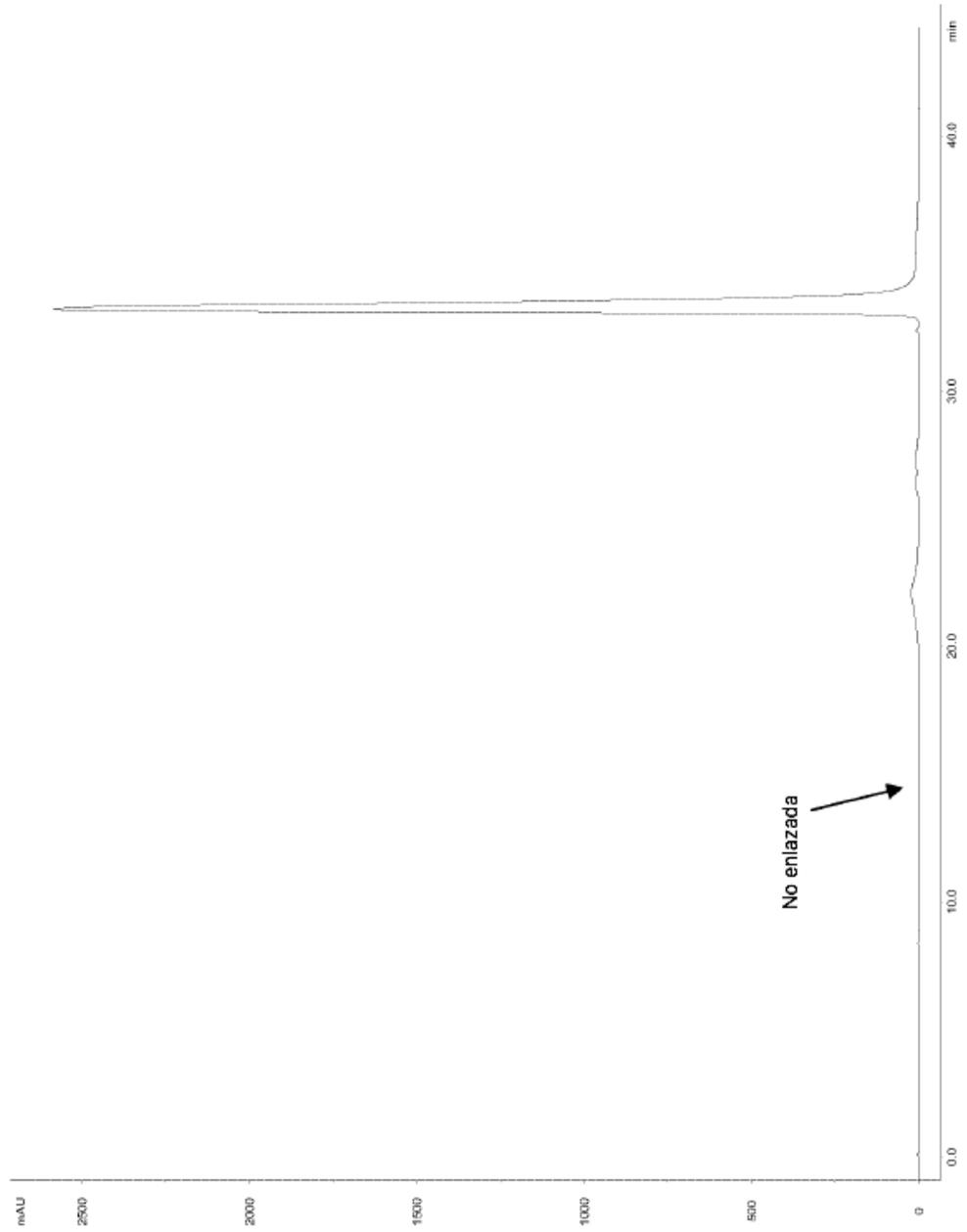
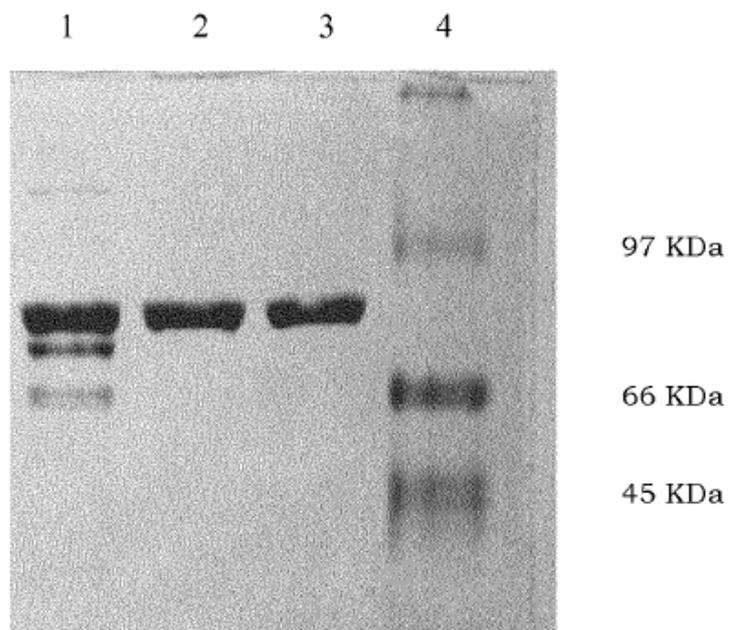


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 8**

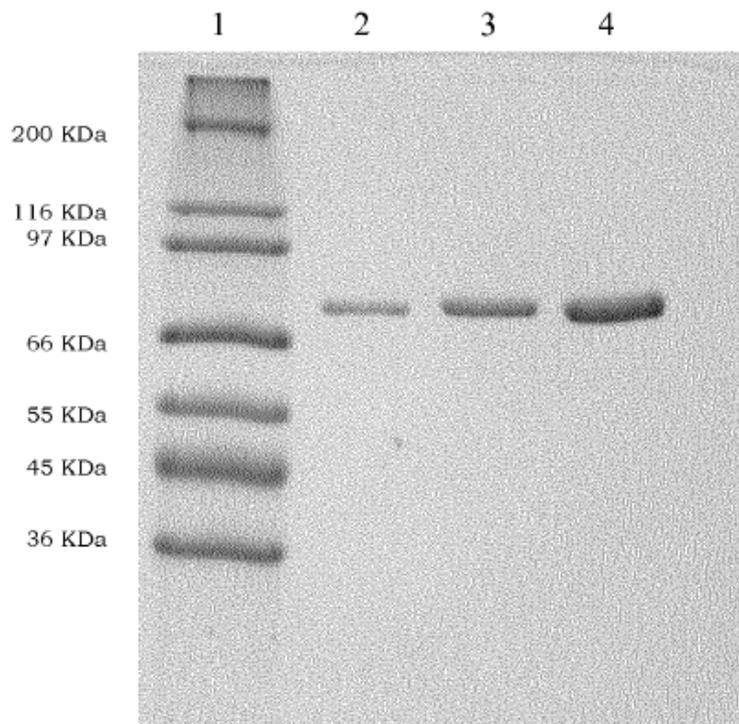


Figura 9

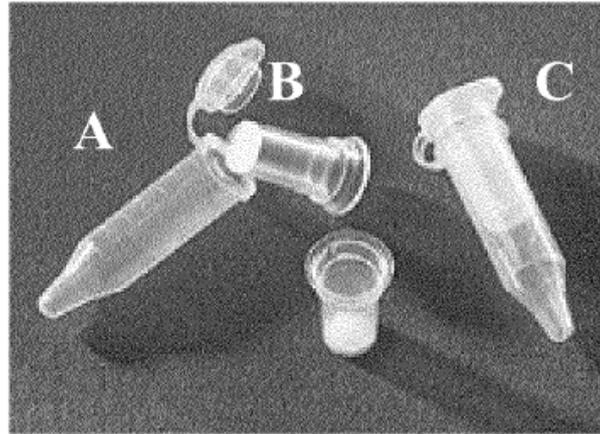
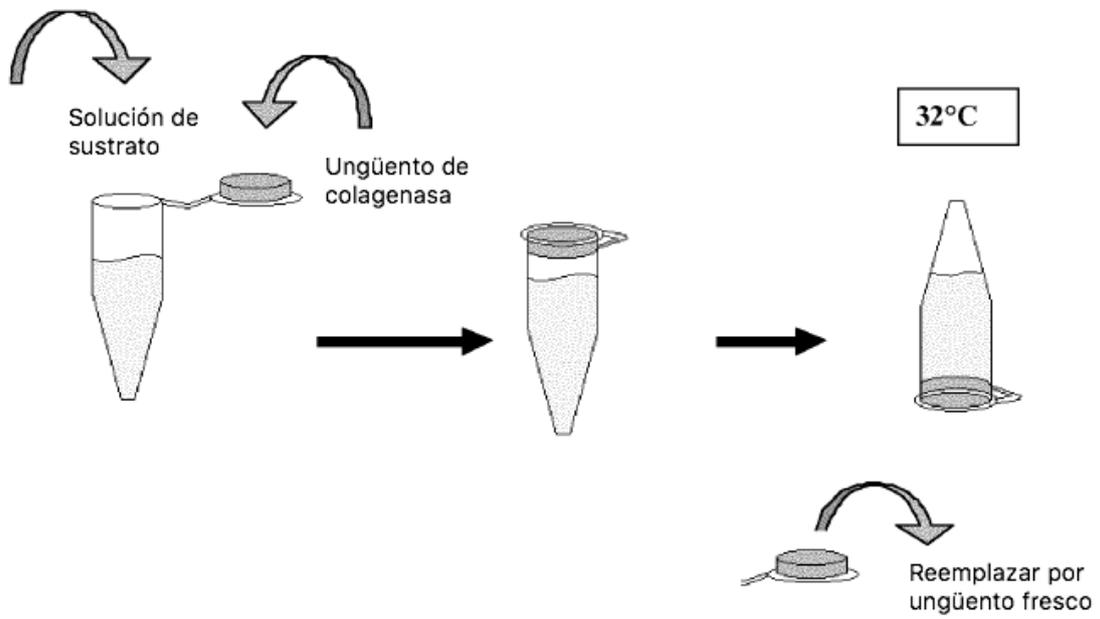


Figura 10



Gráfica 1

