

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 006**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/96** (2006.01)

**C12N 9/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009** **E 12185993 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2607481**

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

30 Prioridad:

**27.08.2008 EP 08015100**

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

**12.07.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)**  
**Grenzacher Strasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 577 006 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

## Estabilización de termolisina en solución acuosa

5 La presente invención se refiere al campo de la bioquímica. La presente invención trata con la enzima proteolítica termolisina que tiende a ser inestable en solución acuosa. La invención proporciona métodos y composiciones para mejorar la estabilidad de la termolisina disuelta en solución acuosa. La termolisina, la termolisina en bruto o un liofilizado que contiene la termolisina y una o más sales, se pone en contacto con un tampón acuoso con una concentración de sal baja y se forma una primera solución. Posteriormente, se añade una sal adicional en forma  
10 sólida y se disocia, formando de ese modo una segunda solución que contiene la termolisina en una forma estabilizada.

## Antecedentes de la invención

15 La termolisina [EC 3.4.24.27; Número de registro CAS 9073-78-3] es una metaloproteinasas neutral termoestable (también referida aquí como "proteasa neutral") producida en el caldo de cultivo de *Bacillus thermoproteolyticus* (Endo, S., J., Ferment. Technol. 40 (1962) 346-353; Matsubara, H., Feder, J., en: 3<sup>o</sup> Ed., P., D., (Ed.), The Enzymes, vol 3, Academic Press, New York, 1971, pp. 721-795). Se requiere un ion zinc para la actividad enzimática y cuatro iones de calcio para la estabilidad estructural (Latt, S., A., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37 (1969) 333-339; Feder, J., et al. Biochemistry 10 (1971) 4552-4556; Tajima, M., et al. Eur. J. Biochem. 64 (1976) 243-247) y cataliza específicamente la hidrólisis de los enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos hidrófobos (Moriyama, K., Tsuzuki, H., Eur. J. Biochem. 15 (1970) 374-380; Inouye, K., et al. Biochem. J. 315 (1996) 133-138). La termolisina se utiliza ampliamente para la formación del enlace peptídico a través de la reacción inversa de hidrólisis (Oyama, K., et al., J. Chem. Soc. Perkin II (1981) 356-360; Nakanishi, K., et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 613  
20 (1990) 652-655; Trusek-Holownia, A., J. Biotechnol. 102 (2003) 153-163). El gen npr que codifica la termolisina se aisló de *B. thermoproteolyticus* (O'Donohue, M., J., et al., Biochem. J. 300 (1994) 599-603). El análisis de secuencia revela que la termolisina se sintetiza como una pre- proteína que consiste en un péptido señal (28 residuos), una prosequencia (204 residuos), y una secuencia madura (316 residuos) (O'Donohue, M., J., et al., supra). La prosequencia actúa como una chaperona intramolecular que conduce a una escisión autocatalítica del enlace peptídico que une la prosequencias y la secuencia madura (O'Donohue, M., J., et al., J. Biol. Chem. 271 (1996) 26477-26481, Marie-Claire, C., et al, J. Biol. Chem. 273 (1998) 5697-5701; Marie-Claire, C., et al., J. Mol. Biol. 285  
25 (1999) 1911-1915).

35 La extinción teórica a 280 nm de la termolisina intacta en agua se puede calcular utilizando la "herramienta ProtParam", que está disponible al público a través de Internet (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). ProtParam es una herramienta que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos para una determinada proteína almacenada en Swiss-Prot o TrEMBL o para una secuencia introducida por el usuario. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, pI teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropaticidad. En consecuencia, puede ser calculado el valor de la absorbancia teórica en agua de A (1 mg / ml), de 1,696 a 280 nm.  
40

El fabricante de termolisina (Daiwa Kasei K.K., Japón) refiriéndose a Ohta, Y. et al. (J. Biol. Chem. 241 (1966) 5919 hasta 5925) indica una absorbancia de A (1 mg / ml), de 1,765 a 280 nm en tampón Tris HCl 50 mM, pH 7.

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

50 La termolisina se puede obtener como un liofilizado de proveedores comerciales. Daiwa Kasei K.K. (Japón) distribuye una termolisina con un peso molecular de 34.600 Da (Daltons), un pH óptimo a un pH de 8,0, y una temperatura óptima en el intervalo de 65 °C y 70 °C. Según el fabricante, la enzima es estable en un intervalo de pH de pH 5,0 y pH 8,5. Se indica una solubilidad de 0,02% en solución tampón diluida. Se puede comprar termolisina doblemente cristalizada como un polvo liofilizado amorfo, en el que la proteína enzimática en la materia seca es del 60% [p/p] o superior. El secado de la materia contiene, además, acetato de calcio anhidro (alrededor del 20% [p/p]) y acetato de sodio anhidro (alrededor del 10% [p/p]). Para más cristalización el fabricante describe un método que comprende las etapas de suspender el liofilizado a una concentración en el intervalo de 1% [p/ v] y 5% [p/ v] en una solución acuosa de calcio-acetato 0,01 M. El material en suspensión se disuelve mediante la adición suficiente por goteo de hidróxido de sodio 0,2 N con agitación para llevar el pH de la solución acuosa a un valor en el intervalo de pH 11,0 y pH 11,4. Después de la eliminación de cualquier residuo no disuelto, el pH de la solución se ajusta a pH 6,0 con ácido acético 0,2 N. La cristalización se completa generalmente en aproximadamente 2 días. Todo el proceso se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 0 °C y 2 °C.  
55  
60

Las preparaciones de termolisina también están disponibles a partir de Daiwa Kasei K.K. (Japón) bajo el nombre comercial Thermoase.

65 El documento PE 0 640 687 describe una solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> 7 mM y NaCl 1,75 M en el que Thermoase se

disolvió para dar lugar a una concentración de aproximadamente 36 mg/ml. La pureza de termolisina en el polvo de Thermoase seco fue aproximadamente del 20%. Teniendo en cuenta la pureza, la concentración de termolisina en la solución acuosa fue de aproximadamente 7 mg / ml.

5 Inouye, K., et al. (J. Biochem. 123 (1998) 847-852) describió que la termolisina es una proteína moderadamente soluble. Se sugirió que la superficie de la proteína es hidrófoba en gran medida y el hecho de que la termolisina se puede purificar de manera eficiente por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica apoya esta noción particular (Inouye, K., et al., Protein Expression and Purification 46 (2006) 248-255). Como consecuencia de su baja solubilidad, la enzima tiene una fuerte tendencia a precipitar al cabo de horas a partir de soluciones recién preparadas.

15 Inouye, K. et al. (J Biochem., Supra) demostró además que la solubilidad de la termolisina en un disolvente acuoso se puede aumentar si ciertas sales neutras se disuelven en el disolvente cuando se pone en contacto con una preparación liofilizada de termolisina. El efecto ha demostrado ser dependiente de (1) temperatura, (2) la sal neutra presente en el disolvente, y (3) la concentración de la sal neutra correspondiente. En el documento de Inouye, K. et al. (J. Biochem. supra) la Figura 2 describe los resultados de una serie de experimentos en los que una cantidad excesiva de polvo liofilizado de termolisina (preparación de termolisina tres veces cristalizada y liofilizada (Daiwa Kasei KK, Osaka, Japón; Lote T8BA51; se usó sin purificación adicional) se mezcló con un "tampón estándar" (CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris HCl 40 mM, pH 7,5) que contenía adicionalmente una sal a una concentración predeterminada (en el rango de 0,5 M y 5 M). la concentración de proteína disuelta se determinó espectrofotométricamente usando un valor de absorbancia, A (1 mg / ml), a 277 nm de 1,83 y una masa molecular de 34,6 kDa.

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

Tabla 1

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

30

Tabla 2

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

§ fuera del rango de detección

Tabla 3

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

35

Tabla 4

Concentraciones de proteína (en [mg/ml]) soluble a 37 °C en tampón estándar que contiene sal						
		concentración de sal sal en tampón estándar				
		3,0 M	3,5 M	4,0 M	4,5 M	5,0 M

sal	NaCl	~7,4	~5,5	~3,1	~2,3	~1,0
	KCl	~3,1	~2,8	~2,2	~1,9	~0,6
	LiCl	~7,0	~8,8	~11,3	~18	~22,3
	NaBr	~22,2	~24,4	~26,3	~29	~33,1
	NaJ	~36,7	~38,1	~35,3	~38,6	~38,0

En consecuencia, para las sales seleccionadas las mayores concentraciones de proteína soluble fueron cada uno de aproximadamente

- 5 8,8 mg/ml a 37 °C en presencia de NaCl 2,5 M,  
12,2 mg/ml a 0 °C en presencia de NaCl 2 M,  
4,2 mg/ml a 37 °C en presencia de KCl 2 M,  
7,5 mg/ml a 0 °C en presencia de KCl 1,5 M,  
10 22,3 mg/ml a 37 °C en presencia de LiCl 5 M,  
26,3 mg/ml a 0 °C en presencia de LiCl 5 M,  
33,1 mg/ml a 37 °C en presencia de NaBr 5 M,  
40 mg/ml a 0 °C en presencia de NaBr 3 M,  
38,6 mg/ml en 37 °C en presencia de NaJ 4,5 M, y  
15 > 45 mg/ml a 0 °C en presencia de NaJ 5 M.

La termolisina es una proteasa agresiva que en solución produce un ataque autoproteolítica. De este modo, ambas preparaciones cristalizada y liofilizada de la termolisina, así como soluciones de tales preparaciones contienen cantidades de diferentes fragmentos autoproteolíticos de termolisina.

- 20 Con el fin de limitar el ataque autoproteolítico, se aplican bajas temperaturas a las soluciones que contienen termolisina. Sin embargo, en tales condiciones solamente se reduce la actividad enzimática (es decir, aún está presente cierta actividad proteolítica), y no produce un cese definitivo. En este sentido se observa que Inouye, K. et al. (J Biochem., supra) determina el contenido de proteína de soluciones sin ninguna etapa de purificación. Las concentraciones de proteína detectadas por lo tanto corresponden a mezclas de termolisina intacta y fragmentos de degradación de los mismos.

- 25 En vista del estado de la técnica, es un objeto de la presente invención proporcionar métodos y composiciones con una forma estabilizada de termolisina en una solución acuosa. Al proporcionar una forma estabilizada, se reduce la tendencia de termolisina para precipitar, y las soluciones de la enzima permanecen en un estado homogéneo durante un tiempo prolongado.

- 30 Los inventores han encontrado inesperadamente que mediante la disolución de termolisina primero en un tampón con una baja concentración de iones y añadiendo después una sal y disolviendo la sal en la solución que ya contiene termolisina sorprendentemente permite formar una solución con una alta concentración de termolisina. Al mismo tiempo, bajo estas condiciones de acuerdo con la invención la termolisina disociada se estabiliza en la solución, es decir, la solución permanece clara por una mayor cantidad de tiempo durante el cual no se forma precipitado.

- 40 La invención proporciona un beneficio significativo cuando tienen que mantenerse cantidades de termolisina en solución para dispensar alícuotas de la misma, o para la fabricación de mezclas con preparaciones de otras enzimas, tales como enzimas de colagenasa. Tales mezclas de enzimas proteolíticas son de uso particular en la disociación de tejido de los órganos para la separación de los subconjuntos de células del tejido.

#### 45 Resumen de la invención

- Un primer aspecto de la presente invención es una composición líquida que comprende la termolisina en una forma disociada y a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, en el que a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y produciendo una primera solución, en la que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende (i) una sal de tampón capaz de mantener un pH en el intervalo de pH entre 4,5 y 9, (ii) una o más sales, y (iii) termolisina, y en la primera solución de la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración total de una o más sales incluyendo la(s) sal(es) del tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la posterior etapa (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y cuando la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, en la que la turbidez se determina por

inspección visual de atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un fotómetro o por la medición de la luz dispersada con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados en las mismas concentraciones que en la composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.

5 Un segundo aspecto de la presente invención es una composición líquida que comprende la termolisina en una forma disociada y a una concentración en el intervalo de aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 23 mg/ml, en el que a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una  
10 solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y produciendo una primera solución, en la que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende (i) una sal de tampón capaz de mantener un pH en el intervalo de pH entre 4,5 y 9, (ii) una o más sales, y (iii) termolisina, y en la primera solución de la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el intervalo de aproximadamente 1  
15 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración total de una o más sales incluyendo la(s) sal(es) del tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la posterior etapa (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y cuando la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, en la que la turbidez se determina por inspección visual de atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un  
20 fotómetro o por la medición de la luz dispersada con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados en las mismas concentraciones que en la composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.

Un tercer aspecto de la presente invención es una composición líquida que comprende agua, termolisina en una forma disociada, una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y NaCl disociado con una concentración de iones de sodio disociados en el rango de 100 mM y por debajo de 500 mM en la  
30 composición, y en el que la composición contiene termolisina a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, en el que a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y produciendo una primera solución, en la que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende (i) una sal de tampón capaz de mantener un pH en el intervalo de pH entre 4,5 y 9, (ii) una o más sales, y (iii) termolisina, y en la primera solución de la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la  
40 concentración total de una o más sales incluyendo la(s) sal(es) del tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la posterior etapa (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y cuando la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, seguido de la etapa de diafiltración de la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) frente a un tampón de diafiltración que contiene una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y NaCl disociado a una concentración por debajo de 500 mM, en la que la turbidez se determina por inspección visual de atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un fotómetro o por la medición de la luz dispersada con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados en las mismas concentraciones que en la  
50 composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma

Un cuarto aspecto de la presente invención es el uso de una composición líquida de acuerdo con la invención para el almacenamiento, el transporte, o dispensación de termolisina, en el que la termolisina está en forma disociada.

55 También se describe un método para preparar una solución de termolisina (EC 3.4.24.27) en el que la termolisina disuelta está en forma estabilizada, el método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y produciendo una primera solución, en la que la primera solución comprende (i) una sal tampón capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, (ii) una o más sales, y (iii) termolisina, y en la primera solución la concentración total de las una o más sales incluyendo la sal o sales tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 150 mM, en el que el método comprende además la posterior etapa (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, por lo que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, preparando de este modo una segunda solución en la que la  
60 termolisina disuelta está en una forma estabilizada.

65

## Descripción detallada de la invención

Ciertos términos se utilizan con un significado especial, o se definen por primera vez en esta descripción de la presente invención. Para los fines de la presente invención, los términos utilizados se definen por sus definiciones aceptadas en la técnica, cuando existen, excepto cuando las definiciones entren en conflicto o parcialmente en conflicto con las definiciones que figuran a continuación. En el caso de un conflicto en la definición, el significado de un término se define en primer lugar por cualquiera de las definiciones establecidas a continuación.

El término "que comprende" se utiliza en la descripción de la invención y en las reivindicaciones para definir "que incluye, pero no necesariamente se limita a".

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

Cuando se designa un intervalo de valores numéricos, tales como, pero sin limitarse a, un intervalo de concentración, el rango se indica mediante un primer valor  $n_1$  y un segundo valor  $n_2$  (por ejemplo, "un rango de  $n_1$  y  $n_2$ "). El límite inferior del rango designado se entiende como un valor igual o mayor al primer valor. El límite superior del rango designado se entiende como un valor igual a o inferior al segundo valor. Por lo tanto, un valor de  $x$  en el intervalo designado está dada por  $n_1 \leq x \leq n_2$ . Cuando un rango se indica usando la palabra "entre", el límite superior y el límite inferior se entienden como incluidos en el intervalo. Por lo tanto, la expresión "un valor  $x$  entre  $n_1$  y  $n_2$ " se entiende como  $n_1 \leq x \leq n_2$ .

Si no se indica lo contrario, se entiende que el término "aproximadamente" y el carácter "~" en combinación con un valor numérico  $n$  ("aproximadamente  $n$ ", "~  $n$ ") indica un valor de  $x$  en el intervalo dado por el valor numérico  $\pm 5\%$  del valor, es decir,  $n - 0,05 * n \leq x \leq n + 0,05 * n$ . En caso de que el término "aproximadamente" o el carácter "~" en combinación con un valor numérico  $n$  describe una realización preferida de la invención, el valor de  $n$  es el más preferido, si no se indica lo contrario.

Una "mezcla" es una sustancia producida por la combinación de dos o más materiales diferentes que aparece sin ninguna reacción química. Los objetos no se unen juntos en una mezcla. Una mezcla por lo general se puede separar de nuevo en sus componentes originales. Las mezclas son el producto de una combinación o la mezcla mecánica de sustancias químicas como los elementos y los compuestos, sin unión química u otro cambio químico, de manera que cada sustancia ingrediente conserva sus propias propiedades químicas y composición. Si bien no hay cambios químicos en una mezcla, las propiedades físicas de una mezcla, tales como su punto de fusión, pueden diferir de las de sus componentes. Las mezclas pueden ser homogéneas o heterogéneas.

Las mezclas homogéneas son mezclas que tienen propiedades definidas y consistentes. Las partículas se distribuyen uniformemente. Por ejemplo, cualquier cantidad de una mezcla dada tiene la misma composición y propiedades. Una mezcla homogénea es una mezcla uniforme que consta de una sola fase. Para el propósito de la invención, las soluciones de una o más sales disociadas son ejemplos no limitativos de mezclas homogéneas.

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

Los ejemplos no limitantes de las mezclas no homogéneas (heterogéneas) son un coloide y una suspensión. En el contexto de la invención, una suspensión se entiende como un fluido heterogéneo que contiene partículas sólidas que son suficientemente grandes para la sedimentación. A diferencia de los coloides, las partículas en suspensión se depositan con el tiempo si se dejan. Esto distingue a una suspensión de un coloide en el que las partículas en suspensión son más pequeñas y no se depositan.

En una solución, la sustancia disuelta no existe como un sólido, y el soluto(s) y el disolvente se mezclan homogéneamente. El término "estabilidad" de una solución se refiere a la tendencia de la sustancia disuelta a permanecer en el estado disuelto. Es decir, el término se refiere a la capacidad de que la solución permanezca homogénea durante un intervalo de tiempo dado. Por lo tanto, la estabilidad se puede caracterizar de manera cuantificable mediante la determinación de dicho intervalo de tiempo. Por lo tanto, la sustancia disuelta en una primera solución caracterizada por una estabilidad inferior presenta una mayor tendencia a precipitar o formar un coloide o una suspensión, en oposición a una segunda solución que se caracteriza por una mayor estabilidad en el que dicha tendencia es menor. Como consecuencia de ello, después de una cierta cantidad de tiempo dicha primera solución se convierte en una mezcla heterogénea mientras que dicha segunda solución sigue siendo una mezcla homogénea.

Bajo ciertas condiciones la estabilidad de una solución se puede aumentar, es decir, la tendencia de una sustancia disuelta a precipitar se reduce. Para el propósito de la presente invención, una sustancia con una tendencia reducida a precipitar se refiere como estar en "una forma estabilizada".

La turbidez es una medida de turbidez del agua causada por la presencia de partículas en una suspensión o un coloide. Hay varias formas prácticas para determinar la turbidez, la más directa es medir la atenuación (es decir, reducción de la resistencia) de la luz a medida que pasa a través de una muestra de la columna de agua. Por lo tanto, una manera de determinar la turbidez es la inspección visual, es decir, la inspección a simple vista.

Otra forma de determinación es la medición de la atenuación de la luz con un fotómetro. En este sentido, el término "densidad óptica" (también referido como "DO") denota una medida sin unidades de la transmitancia de un elemento óptico para una longitud dada en una longitud de onda  $\lambda$  dada:

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

por lo que

O = la opacidad por unidad  
 T = la transmitancia por unidad  
 $I_0$  = la intensidad del haz de luz incidente  
 I = la intensidad del haz de luz transmitido.

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

Un modo preferido para determinar la turbidez es medir la luz dispersada. Con este fin, se utiliza frecuentemente un fotómetro de dispersión de la luz. Dependiendo de la dirección en la que se detecta y se cuantifica la dispersión de la luz, hay varios tipos de fotómetros de dispersión conocidos en la técnica. En principio, todos se pueden utilizar para la evaluación cuantitativa de la turbidez en muestras líquidas. El término "dispersión de la luz" incluye colectivamente tanto la dispersión de las ondas de luz por partículas en la muestra, como la reflexión por la materia en partículas en la muestra. La retrodispersión se define como menos de 90 °, hacia la fuente de luz. La dispersión hacia adelante se define como menos de 90 °, o en la misma dirección general o en dirección contraria de la fuente de luz. La mayoría de las unidades de medida de turbidez utilizadas en la actualidad se basan en técnicas de medición de dispersión lateral de 90 °.

La intensidad de la luz dispersada depende de la cantidad de materia no disuelta (en partículas) en la mezcla heterogénea y se puede describir por la Fórmula I:

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

por lo que

F es la intensidad de la luz dispersada  
 $I_0$  es la intensidad de haz de luz entrante  
 $\Phi$  es la relación entre fotones emitidos frente a fotones absorbidos  
 $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar de la sustancia en partículas en la mezcla  
 C es la cantidad de la sustancia en partículas por volumen de la muestra líquida (mezcla heterogénea) en la cubeta  
 d es el espesor del espacio en la cubeta

Para los fines de la invención, las mediciones de dispersión lateral de 90 ° se hacen con un fotómetro de fluorescencia para determinar la nubosidad de las mezclas heterogéneas que contienen termolisina como material particulado. Típicamente, tales mezclas son coloides.

La "termolisina en bruto" en el sentido de la invención es una mezcla de proteínas que consiste principalmente de termolisina sustancialmente no degradada (= intacta) y, además de productos de degradación, por lo general como resultado de un ataque autoproteolítica. Por lo general, alrededor del 70% de la termolisina en bruto se encontró sustancialmente no degradada, mientras que alrededor del 24% de la termolisina en bruto se compone de diferentes productos de degradación que retienen la actividad proteolítica (en diferentes grados), y aproximadamente el 6% son fragmentos proteolíticamente inactivos y otras impurezas. Thermoase es una preparación de termolisina en bruto que se utiliza para ejemplificar los efectos ventajosos de la presente invención. Sin embargo, la presente invención no se limita a la utilización de preparados de Thermoase, y se puede utilizar otras preparaciones de la enzima para practicar la invención.

Thermoase es un liofilizado con un contenido de proteína que se encuentra en el intervalo entre aproximadamente 30% [p/p] y alrededor de 35% p/p]. La proteína en el liofilizado consiste de "termolisina en bruto".

Desde el estado de la técnica se sabe que la solubilidad de la termolisina aumenta si una sal, preferiblemente una sal neutra disociada está presente en el tampón acuoso a utilizar como disolvente de termolisina seca, o de una

composición seca que contiene termolisina. Sin embargo, las soluciones acuosas de termolisina son inestables porque la termolisina disuelta sufre una transición que reduce su solubilidad. La naturaleza precisa de la transición no está clara, pero se puede especular razonablemente que los residuos de aminoácidos de uno o más dominios hidrófobos de la termolisina desempeñan un papel en este proceso. Debido a la transición, la solubilidad de la termolisina disminuye. Como resultado, una solución clara recién preparada de la enzima se vuelve opaca y una porción sustancial de la proteína finalmente precipita. Un ejemplo de la falta de estabilidad se proporciona en el Ejemplo 6, Tablas 13 y 14, N° 1-3. Incluso a concentraciones reducidas del liofilizado y en presencia de aproximadamente 1,1 M de NaCl, la termolisina tiene una fuerte tendencia a precipitar tras ser puesta en solución.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que la transición se puede suprimir y la termolisina se puede estabilizar en solución. Con este fin, la termolisina en bruto o un liofilizado que contiene la termolisina y una o más sales se ponen en contacto con un tampón acuoso con una baja concentración de sal para formar una solución que es estable sólo durante un corto intervalo de tiempo. Posteriormente, se añade una sal adicional en forma sólida y se disocia después en la solución. Después de este paso la termolisina en solución está en una forma estabilizada, que se caracteriza por una tendencia significativamente reducida a precipitar.

De acuerdo con la invención, antes de que el tampón acuoso con la baja concentración de sal entre en contacto con la termolisina, termolisina en bruto o un liofilizado que contiene termolisina, la concentración de sales disociadas, incluyendo la sal de tampón, en el tampón es preferiblemente inferior a 150 mM, preferiblemente en el intervalo de 0,1 mM y 150 mM. Dependiendo de la preparación de la termolisina, la concentración de sal del tampón acuoso aumenta en la medida que la sal presente en la preparación sólida que contiene termolisina está disociada en el tampón.

La sal en forma sólida es preferiblemente una sal neutra con la excepción de una sal de sulfato inorgánica. Una sal sólida preferida se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de las mismas.

El primer paso principal es la formación de una solución transparente que contiene termolisina. En el caso que la preparación de termolisina no permita formar una solución homogénea clara, es necesario un paso de aclaramiento adicional. Por ejemplo, la solución se puede aclarar por medio de filtración, centrifugación u otros medios equivalentes.

Como segundo paso principal, la sal en forma sólida tiene que añadirse a la solución clara recién preparada de termolisina. A una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C la sal en forma sólida se añade preferiblemente no más de 30 min. después de que se obtiene la solución clara de termolisina. Son más preferidos períodos más cortos, tales como no más de 15 min., 10 min., y 5 min.

Al utilizar en la solución de termolisina una concentración total en el intervalo de aproximadamente 1,5 M y 3,5 M de la sal disociada, la termolisina en solución se estabiliza y la solución sigue siendo una mezcla homogénea clara durante un máximo de 16 h o incluso más.

Sorprendentemente, esta solución se puede incluso diafiltrar con un tampón con una concentración de sal inferior; en tal proceso la concentración de la sal disociada que se añadió previamente se puede bajar (véase el Ejemplo 2). La diafiltración a este respecto es un proceso de filtración de flujo cruzado que permite la transferencia de especies de bajo peso molecular, agua y/o disolventes a través de una membrana sin cambiar el volumen de la solución. Este proceso se utiliza para purificar especies retenidas de peso molecular grande (es decir, termolisina sustancialmente intacta), mientras que las especies de bajo peso molecular, incluyendo fragmentos proteolíticos de termolisina, se eliminan. El procedimiento de diafiltración permite al mismo tiempo el intercambio de tampón, permitiendo así un cambio simple de las propiedades de una solución dada antes del proceso de diafiltración.

Incluso en estas condiciones (es decir, durante un proceso de diafiltración) la termolisina se mantiene en una forma estabilizada, es decir la termolisina se mantiene de forma estable en solución. El mismo efecto se observó para las soluciones de termolisina congelada de acuerdo con la invención después de la descongelación.

Por lo tanto, la invención proporciona en particular los medios; composiciones y condiciones para manipular soluciones homogéneas de termolisina durante una cantidad de tiempo prolongado en condiciones reproducibles. Esto es particularmente útil cuando la termolisina se mezcla con otras enzimas o cuando las soluciones de termolisina se dispensan en forma de alícuotas, por ejemplo, al utilizar dispositivos automatizados.

Además, en más detalle, la presente descripción comprende los siguientes elementos:

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

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

5 y en la primera solución de la concentración agregada de una o más sales incluyendo la sal o sales de tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la etapa posterior (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, por lo que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y la disolución de la sal adicional, preparando de este modo una segunda solución en la que la termolisina está disuelta en una forma estabilizada.

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

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

20 4. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 y 2, en el que en el paso (P) la preparación sólida que comprende la termolisina comprende adicionalmente una o más sales.

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

25 6. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que en el paso (P) la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior.

30 7. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que en el paso (P) la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración en el intervalo de aproximadamente 20% [p/p] y 100% [p/p], más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 20% [p/p] y alrededor del 80% [p/p], e incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20% [p/p] y alrededor del 60% [p/p].

35 8. El método de acuerdo con el punto 6 o el artículo 7, en donde en el paso (P) la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración en el intervalo de aproximadamente 20% [p/p] y alrededor del 50% [p/p], más preferible en el intervalo de aproximadamente 20% [p/p] y alrededor del 40% [p/p], e incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 20% [p/p] y alrededor del 30% [p/p].

9. El método de acuerdo con el punto 8, en el que en el paso (P) la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p].

40 10. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que en el paso (P) la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml.

45 11. El método de acuerdo con el punto 10, en el que en el paso (P), la concentración de la preparación sólida está en el intervalo de aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 60 mg/ml, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, y aún más preferible de aproximadamente 30 mg/ml.

50 12. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, en el que en el paso (P) una o más sales de (ii) en la primera solución comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y una combinación de los mismos.

13. El método de acuerdo con el punto 4, en el que en el paso (P) una o más sales en la preparación sólida que comprende la termolisina se seleccionan del grupo que consiste en NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y una combinación de los mismos.

55 14. El método de acuerdo con el punto 13, en el que en el paso (P) la preparación sólida contiene NaCl en el intervalo de aproximadamente 50% [p/p] y alrededor de 70% [p/p], y/o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el rango de aproximadamente el 0,5% [p/p] y alrededor de 7,5% [p/p], y más preferiblemente la preparación sólida contiene NaCl en el intervalo de aproximadamente 60% [p/p] y alrededor del 65% [p/p], y/o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el intervalo de aproximadamente 3% [p/p] y aproximadamente el 6% [p/p].

60 15. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 12 a 14, en el que en la etapa (P) la preparación sólida contiene termolisina en bruto.

65 16. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15, en el que en la etapa (P) la concentración de iones sulfato en la primera solución está en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferible, la concentración de iones sulfato en la primera solución es de aproximadamente 5 mM.

17. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 16, en el que en la etapa posterior (Q) se añade la sal adicional en forma sólida.
- 5 18. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 17, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M.
- 10 19. El método de acuerdo con el punto 18, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 2 M y aproximadamente 3,5 M.
20. El método de acuerdo con el punto 19, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 2 M y aproximadamente 2,5 M.
- 15 21. El método de acuerdo con el punto 19, en el que la concentración total de la sal adicional en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) es de aproximadamente 2,3 M.
22. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 17 a 21, en el que la concentración de iones sulfato en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) es menor de aproximadamente 10 mM.
- 20 23. El método de acuerdo con el punto 22, en el que la concentración de iones sulfato en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 5 mM.
- 25 24. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 23, en el que en la primera solución obtenida en la etapa (P), la concentración total de las una o más sales incluyendo la sal o sales de tampón está en el intervalo de aproximadamente 100 mM y 500 mM, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 300 mM y 400 mM.
- 30 25. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 24, en el que en la etapa (P), el disolvente acuoso comprende iones  $\text{Ca}^{2+}$ .
26. El método de acuerdo con el punto 25, en el que en el disolvente acuoso, la concentración de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, incluso más preferido en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM.
- 35 27. El método de acuerdo con el punto 26, en el que en el disolvente acuoso, la concentración de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  es de aproximadamente 5 mM.
- 40 28. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 27, en el que en el paso (P) el disolvente acuoso comprende una sal tampón a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 100 mM, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente 100 mM.
- 45 29. El método de acuerdo con el punto 28, en el que en el disolvente acuoso de la concentración de la sal de tampón está en el intervalo de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM.
- 50 30. El método de acuerdo con el punto 29, en el que en el disolvente acuoso de la concentración de la sal de tampón está en el intervalo de aproximadamente 15 mM y aproximadamente 25 mM.
31. El método de acuerdo con el punto 30, en el que en el disolvente acuoso de la concentración de la sal de tampón es de aproximadamente 20 mM.
32. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 28 a 31, en el que la sal de tampón se selecciona del grupo que consiste de BES (N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), BisTris (bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano), BisTris propano (1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano), HEPES (ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfónico), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), MOPSO (ácido 3-morfolino-2-hidroxiopropanosulfónico), PIPES (ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico)), TAPS (ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico), TES (ácido N-Tris(hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfónico), TEA (trietanolamina), y Tricina (N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil) glicina).
- 60 33. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 32, en el que en la etapa (P) el pH de la primera solución está en el intervalo de aproximadamente pH 5,5 y aproximadamente pH 8,5.
- 65 34. El método de acuerdo con el punto 33, en el que el pH es de aproximadamente pH 7,5.
35. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 34, en el que en la segunda solución obtenida después

de la etapa (Q) la concentración de termolisina sustancialmente intacta es de aproximadamente 5 mg/ml o superior, y en el que la termolisina en solución está en forma estabilizada.

- 5 36. El método de acuerdo con el punto 35, en el que en la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) la concentración de termolisina sustancialmente intacta es de aproximadamente 5 mg/ml o mayor, y menor que aproximadamente 35 mg/ml.
- 10 37. El método de acuerdo con el punto 35, en el que la sal adicional se selecciona del grupo que consiste de KCl, LiCl, NaCl, NaBr, NaJ, NaNO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos.
- 15 38. El método de acuerdo con el punto 37, en el que la concentración de termolisina en una forma estabilizada es de aproximadamente 10 mg/ml o mayor, y menor que aproximadamente 35 mg/ml.
- 20 39. El método de acuerdo con el punto 38, en el que la concentración de termolisina en una forma estabilizada es de aproximadamente 20 mg/ml.
- 25 40. Una composición líquida que comprende agua, termolisina en una forma disociada, un tampón de disociación de sal capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y una sal disociada seleccionada del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, en el que la composición contiene termolisina a una concentración en el intervalo de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
- 30 41. Una composición líquida que comprende agua, termolisina en una forma disociada, un tampón de disociación de sal capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y una sal disociada se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, en el que la composición es una solución homogénea durante cinco horas o más, y la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 23 mg/ml.
- 35 42. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 40 o 41, obteniendo la composición líquida mediante un método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39.
- 40 43. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 40 a 42, en el que la termolisina disociada está en una forma estabilizada.
- 45 44. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 40 a 43, en el que a una temperatura en el rango de aproximadamente 2 °C y aproximadamente de 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual aproximadamente a la turbidez de una solución de referencia, por lo que dicha solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados a las mismas concentraciones respectivas que en la composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 41 y 42, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.
- 50 45. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 40 a 44, se obtiene mediante un método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39 y se incuba a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C, dicha composición es una solución homogénea en un intervalo de incubación de 0-5 horas, aún más preferible en un intervalo de incubación de más de 5 horas.
- 55 46. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 44 y 45, en el que la termolisina disociada está sustancialmente intacta.
- 60 47. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 44 a 46, en el que a una temperatura en el rango de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C durante al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual aproximadamente a la turbidez de una solución de referencia, por lo que dicha solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados a las mismas concentraciones respectivas que en la composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 44 a 46, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.
- 65 48. Una composición líquida que comprende agua, termolisina en una forma disociada, una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y NaCl disociado a una concentración por debajo de 500 mM, y en el que la composición contiene termolisina en una concentración en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
49. La composición líquida de acuerdo con el punto 48, en el que el pH de la composición está en el intervalo de pH 7 y pH 8, incluso más preferido en alrededor de pH 7,5.
50. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 48 y 49, en el que la composición comprende iones de Ca<sup>2+</sup>, más preferible los iones de Ca<sup>2+</sup> a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM, y aún más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 mM y aproximadamente

10 mM.

51. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 48 a 50, en el que en la composición la concentración agregada de las sales disociadas incluyendo la sal o sales de tampón está en el rango de aproximadamente 400 mM y aproximadamente 200 mM, y más preferiblemente la concentración agregada de las sales disociadas incluyendo la sal o sales de tampón es de aproximadamente 200 mM.

52. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 48 a 51, en el que en la composición la concentración de iones de sodio disociados está en el rango de 100 mM y 250 mM, más preferible, la concentración de iones de sodio disociados está en el rango de 150 mM y 200 mM, y aún más preferible la concentración de iones de sodio disociados es de aproximadamente 170 mM.

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

54. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 48 a 53, en el que en la composición de la concentración de termolisina sustancialmente intacta está en el intervalo de 0,1 mg/ml y 10 mg/ml, más preferiblemente en el intervalo de 1 mg/ml y 7,5 mg/ml, e incluso más preferido entre 1 mg/ml y 5 mg/ml, incluso más preferido 2,5 mg/ml o 5 mg/ml.

55. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 48 a 54, la composición de líquido se puede obtener por el método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39, seguido de una posterior etapa de diafiltración de la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) contra un tampón de diafiltración que contiene una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el intervalo de pH 4,5 y pH 9, y NaCl disociado a una concentración inferior a 500 mM.

56. La composición líquida de acuerdo el punto 55, en el que el tampón de diafiltración comprende iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM.

57. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 55 y 56, en el que en el tampón de diafiltración la concentración total de sales disociadas incluyendo la sal o sales de tampón está en el intervalo de aproximadamente 400 mM y aproximadamente 200 mM, y más preferible la concentración agregada de las sales disociadas incluyendo la sal o sales de tampón es de aproximadamente 200 mM.

58. El uso de una composición líquida de acuerdo con cualquiera de los puntos 40 a 57 para el almacenamiento, el transporte, o dispensación de termolisina, con lo que la termolisina está en forma disociada.

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

#### Descripción de las Figuras

Figura 1 Resultados de una exploración de longitud de onda como se describe en el Ejemplo 8. La ordenada indica la intensidad de luz en unidades arbitrarias (UA) medida por el detector a 800 nm. El eje de abscisas indica la longitud de onda de la luz incidente. (A) muestra líquida que contiene el tampón acuoso; (B) muestra líquida que contiene el coloide de termolisina en el tampón acuoso.

Figura 2 Resultado ejemplar de un análisis cromatográfico de una solución que contiene Thermoase liofilizada obtenida de la primera etapa descrita en el Ejemplo 2, es decir, sin/antes de un paso adicional de diafiltración. La Thermoase liofilizada se disolvió en un tampón acuoso que contenía NaCl 2,3 M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5; el contenido de proteína de la solución fue de 8,2 mg/ml determinado fotométricamente a 280 nm. La Figura muestra un cromatograma HPLC de una muestra de 50  $\mu\text{l}$  de la solución homogénea. Cinco áreas de picos indicadas de (i) a (v) están marcadas. Las condiciones y parámetros de HPLC se describen en el Ejemplo 2. Ordenadas: mUA; abscisas: tiempo de retención en [min].

Figura 3 Resultado ejemplar de un análisis cromatográfico de una solución que contiene Thermoase liofilizada obtenida de la segunda etapa descrita en el Ejemplo 2, es decir, sin/antes de un paso adicional de diafiltración. Después de la diafiltración, Thermoase era en un tampón acuoso que contenía NaCl 170 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5; el contenido de proteína de la solución después de la diafiltración fue de 4,9 mg/ml determinado fotométricamente a 280 nm. La Figura muestra un cromatograma HPLC de una muestra de 50  $\mu\text{l}$  de la solución homogénea. Tres áreas de picos indicadas de (vi) a (viii) están marcadas. Las condiciones y parámetros de HPLC se describen en el Ejemplo 2. Ordenadas: mUA; abscisas: tiempo de retención en [min].

Ejemplo 1

Preparación de mezclas de un tampón acuoso y termolisina partir de una preparación de Thermoase

5 De acuerdo a la información proporcionada por el fabricante, aproximadamente el 60-65% [p/p] del liofilizado fue NaCl. Además, el liofilizado contenía aproximadamente 5% [p/p] Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (decahidrato). Una cantidad en el intervalo de aproximadamente 30% [p/p] y aproximadamente de 35% [p/p] de Thermoase liofilizada que se utiliza aquí y también en los Ejemplos más adelante, consiste de termolisina en bruto (véase también el Ejemplo 2). Todos los pasos de trabajo descritos a continuación se llevaron a cabo a una temperatura en el rango de 2 °C y 8 °C, si no se indica lo contrario.

15 Se preparó un volumen de 8 l de tampón acuoso (A) que contiene NaCl 2 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. Una cantidad de 200 g de liofilizado de Thermoase seco se mezcló con el tampón acuoso y la mezcla se agitó de forma continuada. Sin embargo, no se obtuvo una mezcla homogénea, la mezcla permaneció turbia y nunca llegó a ser del todo clara. Cerca de 60 min después de la adición del liofilizado, la mezcla se volvió cada vez más opaco y la termolisina comenzó a precipitar.

20 Sorprendentemente, la formación de una mezcla no homogénea como la obtenida con tampón (A) podría evitarse disolviendo primero la preparación Thermoase en un tampón con fuerza iónica baja y añadiendo después la sal sola. Por lo tanto, en un primer paso se preparó un volumen de 6,5 l del tampón acuoso (B) que contiene CaCl<sub>2</sub> 5 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5. Una cantidad de 200 g de liofilizado Thermoase seco se disolvió en tampón (B) y se obtuvo una solución clara. Posteriormente, en una segunda etapa, se añadió 935 g NaCl sólido y se disolvió en la solución. Como tercera etapa, el volumen de la solución se ajustó a 8 mediante la adición de un volumen adicional de tampón acuoso (B) y se mezcló por agitación. Se obtuvo una solución homogénea.

25 Teniendo en cuenta que alrededor del 60-65% [p/p] del liofilizado consiste en NaCl, la concentración final de NaCl en la solución era aproximadamente 2,3 M. La concentración final de termolisina en bruto en solución estaba en el intervalo de aproximadamente 7,5 mg/ml y 8,8 mg/ml que corresponde a una concentración de termolisina sustancialmente no degradada de aproximadamente 5,7 mg/ml (en el rango de aproximadamente 5,2 mg/ml y 6,1 mg/ml).

Tabla 5

Concentraciones de ingredientes de Thermoase calculadas en el proceso de solubilización; primer paso: liofilizado de Thermoase disuelto en un volumen de 6,5 l, antes de la adición de NaCl sólido	
Ingrediente	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	5 mM,
HEPES pH 7,5	20 mM
NaCl	~329 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	~ 5 mM
Sales y sales de tampón	~359 mM
Termolisina en bruto	~ 10 mg/ml
Termolisina intacta	~ 7 mg/ml

35 Tabla 6

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

Tabla 7

Concentraciones finales de Thermoase calculadas e ingredientes de sales en el proceso de solubilización; tercer paso: volumen ajustado a 8 l	
Ingrediente	Concentración
CaCl <sub>2</sub>	5 mM
HEPES, pH 7,5	20 mM
NaCl	~2267 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	~4 mM
Sales y sales de tampón	~2296 mM

Termolisina en bruto	~8,1 mg/ml
Termolisina intacta	~5,7 mg/ml

## Ejemplo 2

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

En primer lugar, una solución de Thermoase liofilizado se preparó usando tampón (B) y el procedimiento de tres pasos como se describe en el Ejemplo 1. En una etapa posterior, la solución se somete a diafiltración, en el que el tampón de la composición líquida se cambió a HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 170 mM, pH 7,5. Sorprendentemente, la termolisina permaneció estabilizada, es decir, la solución diafiltrada se mantuvo homogénea durante 5 horas e incluso más de 5 horas.

Se realizó el análisis por HPLC de la solución del liofilizado de Thermoase antes y después de la diafiltración usando HPLC con una columna GL SUPERDEX™ 75pg de 10 mm/300 mm (GE Bioscience) como fase estacionaria. La fase móvil fue un tampón acuoso que contiene NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 50 mM, pH 7,5. Los volúmenes de muestra fueron de 50 µl cada una. El caudal fue de 0,5 ml/min, cada ejecución de HPLC se realizó durante 80 min. La unidad de detección era un detector de absorbancia UV-Vis operado a 280 nm.

En cada muestra el pico principal se eluyó con un tiempo de retención medio de aproximadamente 27 min 34 seg (ver los picos en el área (I) mostrada en la Figura 2 y en el área (vi) mostrado en la Figura 3).

Las muestras analizadas después del primer paso (sin diafiltración) típicamente mostraron picos que podrían ser agrupados en cinco áreas diferentes, como se muestra en la Figura 2. El área bajo el pico principal (denotado (i)) refleja sustancialmente termolisina no degradada (= intacta). El hombro del pico correspondiente a la elución después de un tiempo de retención de aproximadamente 20 min 15 seg se asumió que reflejaba dímeros de termolisina. Los picos bajo las áreas denotadas (ii), (iii) y (iv) correspondían principalmente a productos de degradación de la termolisina. Los picos bajo el área denotada (v) reflejan principalmente fragmentos de termolisina más fuertemente degradada (en distintos grados), así como impurezas.

Las muestras se analizaron después de la segunda etapa, es decir, después de la diafiltración se mostraron resultados como se muestra a modo de ejemplo en la figura 3. En particular, la cantidad relativa de fragmentos de degradación e impurezas correspondientes a las áreas de los picos denotados (vii) y (viii) se redujeron en preparaciones diafiltradas. Además, el pico principal en el área designada (vi) por lo general era mucho más claro cuando se compara con su homólogo en la figura 2. Por lo tanto, el cromatograma después de la diafiltración indicó una separación sustancial y purificación de termolisina no degradada.

Tabla 8

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

Tabla 9

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

Para análisis adicionales, se prepararon dos soluciones madre diferentes de termolisina (i) 5 mg/ml y (ii) 2,5 mg/ml, por lo tanto en ambas concentraciones, el tampón acuoso se ajustó a HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 170 mM, pH 7,5 a modo de diafiltración; la conductividad del tampón con la termolisina disuelta fue de aproximadamente 20 mS/cm. Ambas soluciones se esterilizaron por filtración estéril y se dispensaron en alícuotas.

Desde el punto de tiempo cuando el liofilizado se disolvió en el primer tampón acuoso hasta que se obtuvieron las

alícuotas de las dos soluciones madre, la termolisina permaneció disociada en solución durante aproximadamente 6 h. Ambas soluciones madre permanecieron transparentes durante todo el proceso.

Además, una cantidad de 5 mg de Thermoase liofilizado se disolvió en 1 ml de un tampón acuoso que contenía CaCl<sub>2</sub> 1 mM y HEPES 5 mM, pH 7,5. Una alícuota de 50 µl de la solución se analizó por HPLC bajo las condiciones estándar (ver más arriba) utilizando una columna de Superdex® 75 10/300, una velocidad de bomba de 0,5 ml/min y detección de UV/Vis a 280 nm. La fase móvil fue CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 200 mM, HEPES 50 mM, pH 7,5 en agua. El pico de termolisina se cuantificó en relación con los otros picos obtenidos. El uso de este enfoque de la cantidad relativa de termolisina sustancialmente intacta se determinó en varios lotes de Thermoase. Cuatro determinaciones independientes indicaron que en promedio el 70% de la fracción de proteína de Thermoase era termolisina intacta. Los valores individuales encontrados fueron 59%, 72%, 71% y 76%.

Una cantidad ejemplar de 100 g de Thermoase liofilizada contenía aproximadamente 33 g de termolisina en bruto, alrededor de 65 g de NaCl, y alrededor de 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se observó variación del contenido de proteína en las preparaciones de Thermoase en el intervalo de 30 g y 35 g por cada 100 g de liofilizado. Típicamente, la fracción de termolisina sustancialmente no degradado y enzimáticamente activa con un peso molecular de aproximadamente 34.600 Da (también referido como "termolisina") fue aproximadamente del 23% en el liofilizado seco. La cantidad restante de aproximadamente el 10% de proteína en el liofilizado seco consistió principalmente de productos de degradación de la termolisina de los cuales aproximadamente el 80% mantenía la actividad proteolítica. El resto comprendía fragmentos de termolisina más fuertemente degradada y otras impurezas. Por lo tanto, la "termolisina en bruto" en el sentido de la invención se entiende como una mezcla de proteínas que consiste en (a) aproximadamente 70% de termolisina sustancialmente no degradada, (b) aproximadamente 24% de productos de degradación de termolisina que retienen la actividad proteolítica (en diferentes grados) y (c) aproximadamente el 6% de los fragmentos proteolíticamente inactivos y otras impurezas.

### Ejemplo 3

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

Las alícuotas de las dos soluciones madre de termolisina con las concentraciones de (i) 5 mg/ml y (ii) 2,5 mg/ml obtenidas de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2 (es decir, incluyendo diafiltración) se incubaron a diferentes temperaturas. En intervalos de 30 min. se evaluó la turbidez mediante inspección visual y mediciones tal como se describe en el Ejemplo 9. Se registró el tiempo de exposición a la correspondiente temperatura antes de que una solución se volviera turbia. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Hasta el momento, todos los pasos de trabajo se realizaron a 8 °C o inferior, es decir a temperaturas en el intervalo entre 2 °C y 8 °C. Ambas soluciones madre permanecieron transparentes durante todo el proceso.

Tabla 10

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

### Ejemplo 4

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

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

Tabla 11

Temperaturas de incubación antes de la congelación y tiempo después de la descongelación, durante el cual la solución de termolisina permaneció clara	
Temp. antes de la congelación	Tiempo de permanencia de la solución homogénea (claro) después de la descongelación
4 °C	7 h
6 °C	6 h
8 °C	4 h
10 °C	1 h

## Ejemplo 5

5 Estabilidad de soluciones con diferentes concentraciones de termolisina después de la congelación y descongelación

10 Las soluciones madre con soluciones de termolisina en el intervalo de 1 mg/ml y 5 mg/ml se prepararon de manera similar como se describe en el Ejemplo 2. Las alícuotas de las soluciones madre se congelaron a -20 °C y se almacenaron a esa temperatura durante 7 días. Después de descongelar, las alícuotas se incubaron a 8 °C. Se registró el tiempo de exposición a la temperatura antes de que la solución se volviera turbia. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

15 Tabla 12

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

## Ejemplo 6

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

25 El liofilizado de Thermoase se disolvió en concentraciones de 100, 50, y 25 mg/ml en HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7,5. Directamente después, se añadió una sal seleccionada del grupo que consiste en Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaCH<sub>3</sub>COO, NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, y NaJ y se disolvió. Como control, no se añadió ninguna sal. La Tabla 13 indica las concentraciones de los iones correspondientes en las soluciones, teniendo en cuenta las cantidades presentes en el liofilizado. Hay que tener en cuenta que los iones presentes en el tampón HEPES no se contabilizan en la tabla.

Tabla 13

Soluciones de termolisina con diferentes sales añadidas								
Nº	Sal añadida	conc. de liofilizado en [mg/ml]	termolisina en bruto en [mg/ml]	termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	cr ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	CH <sub>3</sub> CO O <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , J <sup>-</sup> [M]
1	-	100	~ 33	~ 23	1,125	1,122	0,006	0
2		50	~16,5	~11,5	0,562	0,566	0,003	0
3		25	~8,3	~5,8	0,281	0,288	0,002	0
4	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	~ 33	~ 23	5,125	1,122	2,006	0
5		50	~16,5	~11,5	4,562	0,566	2,003	0
6		25	~8,3	~5,8	4,281	0,288	2,002	0
7	NaCH <sub>3</sub> COO	100	~ 33	~ 23	3,125	1,122	0,006	2,0
8		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
9		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
10	NaCl	100	~ 33	~ 23	3,125	3,122	0,006	2,0
11		50	~16,5	~11,5	2,562	2,566	0,003	2,0
12		25	~8,3	~5,8	2,281	2,288	0,002	2,0
13	NaBr	100	~ 33	~ 23	3,125	1,122	0,006	2,0
14		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
15		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
16	NaNO <sub>3</sub>	100	~ 33	~ 23	3,125	1,122	0,006	2,0

17		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
18		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0
Nº	Sal añadida	conc. de liofilizado en [mg/ml]	termolisina en bruto en [mg/ml]	termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	cr ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	CH <sub>3</sub> CO O <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , J <sup>-</sup> [M]
19	NaJ	100	~ 33	~ 23	3,125	1,122	0,006	2,0
20		50	~16,5	~11,5	2,562	0,566	0,003	2,0
21		25	~8,3	~5,8	2,281	0,288	0,002	2,0

La Tabla 14 indica, con respecto de las mezclas dadas en la Tabla 13, si y por cuánto tiempo se obtuvo una solución homogénea estable (es decir clara). La turbidez se evaluó mediante inspección visual y mediciones como se describe en el Ejemplo 9. Los símbolos presentados en la tabla indican lo siguiente:

- 5 Valoración mediante inspección visual, UA 90 ° medición de dispersión lateral
- {# # #} opaco 901 -> 1000 (desbordamiento)
- {0 0} nublado 401 - 900
- {o} ligeramente nublado 131 - 400
- 10 { } claro 0-130

Tabla 14

Estabilidad de las soluciones de termolisina en presencia de diferentes sales añadidas							
Nº	sal añadida	[0,1 h]	[1 h]	[5 h]	[10 h]	[15 h]	[20 h]
1	-	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
2		{###}> 1000	{# # #}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
3		{###}> 1000	{###}> 1000	{# # #}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
4	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
5		{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
6		{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
7	NaCH <sub>3</sub> COO	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
8		{0} 150	{0} 329	{00} 680	{###} 958	{###}> 1000	{###}> 1000
9		{ } 82	{ } 85	{ } 113	{0} 268	{00} 479	{00} 520
10	NaCl	{###} 912	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000	{###}> 1000
11		{ } 110	{ } 120	{ } 126	{0} 189	{0} 302	{00}/507
12		{ } 85	{ } 87	{ } 81	{ } 92	{ } 102	{ } 83
13	NaBr	{ } 110	{ } 116	{ } 114	{ } 95	{ } 104	{ } 112
14		{ } 95	{ } 110	{ } 125	{ } 85	{ } 93	{ } 85
15		{ } 88	{ } 100	{ } 79	{ } 87	{ } 106	{ } 102
16	NaNO <sub>3</sub>	{ } 75	{ } 85	{ } 103	{ } 102	{ } 88	{ } 86
17		{ } 68	{ } 65	{ } 73	{ } 69	{ } 100	{ } 79
18		{ } 88	{ } 59	{ } 100	{ } 67	{ } 95	{ } 86
19	NaJ	{ } 78	{ } 93	{ } 112	{ } 85	{ } 96	{ } 79
20		{ } 112	{ } 105	{ } 126	{ } 102	{ } 98	{ } 115
21		{ } 109	{ } 96	{ } 75	{ } 112	{ } 87	{ } 83

15 Los resultados se tabulan como {evaluación visual} y "valor numérico" (UA, 90 ° medición de dispersión lateral)

Ejemplo 7

Estabilidad de soluciones que contienen termolisina en presencia de diferentes sales

20 El liofilizado de Thermoase se disolvió en concentraciones de 100, 50, y 25 mg/ml en HEPES 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM pH 7,5. Directamente después, se añadió una sal seleccionada del grupo que consiste en KCl, NaCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> y y se disolvió. Como control, no se añadió ninguna sal. La Tabla 15 indica las concentraciones de los iones correspondientes en las soluciones, teniendo en cuenta las cantidades presentes en el liofilizado. Hay que tener en

25 cuenta que los iones presentes en el tampón HEPES no se contabilizan en la tabla.

Tabla 15

Soluciones de termolisina con diferentes sales añadidas								
Nº	Sal añadida	conc. de liofilizado en [mg/ml]	termolisina en bruto en [mg/ml]	termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	cr ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	CH <sub>3</sub> CO O <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , J <sup>-</sup> [M]
22	-	100	33	23	1,125	1,122	0,006	0

23		50	16,5	11,5	0,562	0,566	0,003	0
24		25	8,3	5,8	0,281	0,288	0,002	0
Nº	Sal añadida	conc. de liofilizado en [mg/ml]	termolisina en bruto en [mg/ml]	termolisina en [mg/ml]	Na <sup>+</sup> ~ [M]	cr ~ [M]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ~ [M]	CH <sub>3</sub> CO O <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , J <sup>-</sup> [M]
25	KCl	100	33	23	1,125	3,122	0,006	2,0
26		50	16,5	11,5	0,562	2,566	0,003	2,0
27		25	8,3	5,8	0,281	2,288	0,002	2,0
28	NaCl	100	33	23	3,125	3,122	0,006	2,0
29		50	16,5	11,5	2,562	2,566	0,003	2,0
30		25	8,3	5,8	2,281	2,288	0,002	2,0
31	LiCl	100	33	23	1,125	3,122	0,006	2,0
32		50	16,5	11,5	0,562	2,566	0,003	2,0
33		25	8,3	5,8	0,281	2,288	0,002	2,0
34	MgCl <sub>2</sub>	100	33	23	1,125	5,122	0,006	2,0
35		50	16,5	11,5	0,562	4,566	0,003	2,0
36		25	8,3	5,8	0,281	4,288	0,002	2,0
37	CaCl <sub>2</sub>	100	33	23	1,125	5,122	0,006	2,0
38		50	16,5	11,5	0,562	4,566	0,003	2,0
39		25	8,3	5,8	0,281	4,288	0,002	2,0

La Tabla 16 indica, respecto a las mezclas proporcionadas en la Tabla 15, si y durante cuánto tiempo se obtiene una solución de termolisina homogénea estable (es decir, clara, no turbia). La turbidez se evaluó mediante inspección visual y mediciones como se describe en el Ejemplo 9. Los símbolos presentados en la tabla indican lo siguiente:

5

	Valoración mediante inspección visual	UA 90 ° medición de dispersión lateral
{# # #}	opaco	901 -> 1000 (desbordamiento)
{0 0}	nublado	401 - 900
{o}	ligeramente nublado	131 - 400
{}	claro	0-130

10

Tabla 16

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

Los resultados se tabulan como {evaluación visual} y "valor numérico" (UA, 90 ° medición de dispersión lateral)

15

Ejemplo 8

Determinación de la turbidez

20

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

25

Se proporcionaron dos muestras líquidas, siendo la primera un tampón acuoso homogéneo con CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 170 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5 como ingredientes disueltos; la segunda muestra fue un coloide que consiste en el mismo tampón y, además, aproximadamente 5 mg/ml de termolisina (ver también los Ejemplos 2 y 3). Antes de que

se tomaran las mediciones, el coloide se dejó formar toda la noche a 10 °C.

Los valores de los parámetros del instrumento fueron los siguientes:

5	Instrumento:	Cary Eclipse
	Número de serie del instrumento	EL06033429
	Modo de datos:	fluorescencia
	Modo de exploración	emisión
	Modo X	longitud de onda (nm)
10	Inicio (nm)	200
	Parada (nm)	1000
	Ex. longitud de onda (nm)	800
	Ex. Hendidura (nm)	5
	Em. Hendidura (nm)	5
15	Tasa de lectura (nm/min)	600
	Intervalo de datos (nm)	1
	Tiempo promedio (s)	0,1
	Filtro de excitación	automático
	Filtro de emisiones	abierto
20	Voltaje PMT (V)	Medio
	Espectro corregido	Apagado
	Suspensor multicelda	Multicelda
	Multi cero	Apagado

25 Las muestras líquidas se analizaron en cubetas de cuarzo estándar. Ambas muestras se caracterizaron por medio de un escáner de longitud de onda, por lo que la longitud de onda de la luz entrante se aumentó de 200 nm a 1000 nm. La longitud de onda de detección se mantuvo constante a 800 nm. No se detectó fluorescencia ni opalescencia. La luz dispersada se detectó a la longitud de onda de la luz incidente. Los resultados se representan en la Figura 1 (A) y (B). Para la muestra de tampón clara la intensidad medida de la luz dispersada fue de alrededor de 100 unidades arbitrarias (UA). Para el coloide de la segunda muestra la luz dispersada creó un desbordamiento en el detector.

#### Ejemplo 9

35 Mediciones visuales de inspección y de turbidez

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

	Instrumento:	Cary Eclipse
	Número de serie del instrumento	EL06033429
	Modo de datos:	fluorescencia
45	Em. longitud de onda (nm)	800
	Ex. longitud de onda (nm)	800
	Ex. Hendidura (nm)	5
	Em. Hendidura (nm)	5
	Tiempo promedio (s)	0,1
50	Filtro de excitación	automático
	Filtro de emisiones	abierto
	Voltaje PMT (V)	Medio
	Suspensor multicelda	Multicelda
	Multi cero	Apagado
55	Réplicas	1
	Promedio de muestras	Apagado

Las muestras líquidas se analizaron en cubetas de cuarzo estándar.

60 La inspección visual de muestras de líquido que contienen termolisina en tubos de ensayo se llevó a cabo mediante la agrupación de las muestras en cuatro categorías: (i) "claro", (ii) "parcialmente nublado", (iii) "nublado", (iv) "opaco". Por lo tanto, las categorías (ii) a (iv) reflejan el aumento del grado de turbidez. Las categorías se correlacionaron con la lectura de unidades arbitrarias (UA) como se indica en la Tabla 17.

65

Tabla 17

Turbidez de muestras líquidas, categorías		
Categoría	Ejemplos de valores medidos	Rango de valores para la categoría
claro	114; 85; 95	0-130
ligeramente nublado	182; 188; 236; 248; 304; 297	131-400
nublado	760; 783; 810; 815; 847	401-900
opaco	~ 1000; > 1000	901 -> 1000 (= desbordamiento)

5 Para los fines de la presente invención, una solución "clara" que contiene termolisina se caracteriza por una turbidez (determinado como más arriba) que es aproximadamente equivalente a (es decir, aproximadamente igual a) la turbidez de una solución sin la termolisina pero por lo demás con la misma composición y las concentraciones de los correspondientes ingredientes. De acuerdo con la invención y como se muestra arriba, esto corresponde al rango de 0 UA y 130 UA, más preferiblemente al rango de 50 UA y 130 UA, determinado como dispersión lateral a 90 °  
 10 utilizando luz con una longitud de onda de 800 nm en las condiciones descritas anteriormente.

Ejemplo 10

Detección espectrofotométrica de la proteína de la preparación de Thermoase

15 Todos los procedimientos anteriores a la fotometría se realizaron a temperatura enfriada con hielo. Se proporcionó Thermoase como polvo liofilizado amorfo (Daiwa Kasei K. K.). Una cantidad de Thermoase liofilizada se disolvió en tampón Tris acuoso que contiene CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris HCl 40 mM, pH 7,5 para proporcionar una solución de Thermoase liofilizada con una concentración de 1 mg/ml.

20 En cuanto se obtuvo una solución clara (evaluado mediante inspección visual), se tomaron lecturas fotométricas a 277 nm y a 25 °C.

25 Se analizaron varias veces tres lotes diferentes de Thermoase. Las lecturas fotométricas variaron de 0,57 a 0,61. El impacto potencial de las diferencias entre los valores de A (1 mg/ml) se determinaron a 277 nm y 280 nm se asumió que es insignificante y más pequeño que otras fuentes potenciales de error.

Tabla 18

Porcentaje [p/p] de proteína (termolisina en bruto) en preparaciones de Thermoase utilizando diferentes valores de A (1 mg/ml) como referencia			
A (1 mg/ml)			
Lote de Thermoase	extinción a 277 nm (rango)	1,765	1,83
1	0,60-0,61	34% - 35%	33%
2	0,57-0,59	32% - 33%	31% - 32%
3	0,58-0,60	33% - 34%	32% - 33%

30

## REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida que comprende la termolisina en una forma disociada y a una concentración en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, en el que a una temperatura en el rango de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición, la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y obteniendo una primera solución, en el que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende

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

y en la primera solución, la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración agregada de una o más sales incluyendo las sales de tampón está en el rango de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la etapa posterior (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y en el que la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el rango de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, en la que la turbidez se determina mediante inspección visual de atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un fotómetro o por medición de la dispersión de la luz con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados a las mismas concentraciones correspondientes que en la composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.

2. Una composición líquida que comprende la termolisina en una forma disociada y a una concentración en el rango de aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 23 mg/ml, en el que a una temperatura en el rango de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y obteniendo una primera solución, en el que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende

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

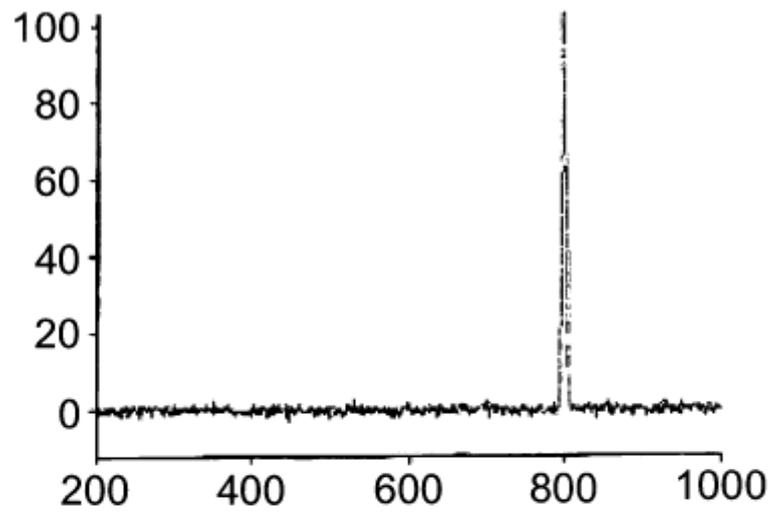
y en la primera solución, la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración agregada de una o más sales incluyendo las sales de tampón está en el rango de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la etapa posterior (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y en el que la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el rango de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, en la que la turbidez se determina mediante inspección visual de atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un fotómetro o por medición de la dispersión de la luz con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados a las mismas concentraciones correspondientes que en la composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.

3. Una composición líquida que comprende agua, termolisina en una forma disociada, una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de pH 4,5 y pH 9, y NaCl disociado con una concentración de iones de sodio disociados en el rango de 100 mM y por debajo de 500 mM en la composición, y en el que la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml, en el que a una temperatura en el rango de aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C y al menos cinco horas después de la formación de la composición de la turbidez de la composición es igual a la turbidez de una solución de referencia, siendo la composición obtenible por un método que comprende la primera etapa (P) de mezclar una preparación sólida que comprende la termolisina con un disolvente acuoso y obteniendo una primera solución, en el que la preparación sólida comprende la termolisina a una concentración de aproximadamente 20% [p/p] o superior, y en el que la primera solución comprende

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

- 5 y en la primera solución, la concentración de la preparación que comprende la termolisina en el disolvente acuoso está en el rango de aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, y la concentración agregada de una o más sales incluyendo las sales de tampón está en el rango de aproximadamente 0,1 mM y 500 mM, y en el que el método comprende además la etapa posterior (Q) de añadir a la primera solución una cantidad medida de una sal adicional, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en NaCl, NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaJ, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, y
- 10 una mezcla de los mismos, y disolver la sal adicional, y en el que la concentración total de la sal adicional en la solución obtenida después de la etapa (Q) se encuentra en el rango de aproximadamente 1,5 M y aproximadamente 5 M, seguido de la etapa de diafiltrar la segunda solución obtenida después de la etapa (Q) frente a un tampón de diafiltración que contiene una sal de tampón disociada capaz de mantener un pH en el rango de pH 4,5 y pH 9, y
- 15 NaCl disociado a una concentración por debajo de 500 mM, en el que la turbidez se determina por inspección visual de la atenuación de la luz, o midiendo la densidad óptica con un fotómetro o por medición de la luz dispersada con un fotómetro de dispersión de luz, en el que la solución de referencia se compone de los mismos ingredientes disociados en las mismas concentraciones correspondientes que en la composición, y en el que la solución de referencia carece de termolisina o fragmentos de la misma.
- 20 4. La composición líquida según la reivindicación 3, en donde la sal adicional es NaCl.
5. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la composición contiene termolisina a una concentración en el rango de aproximadamente 2,5 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.
- 25 6. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 5, en el que en la composición, la concentración agregada de las sales disociadas incluyendo la sal o sales de tampón está en el rango de aproximadamente 400 mM y aproximadamente 200 mM.
- 30 7. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el que en la composición de la concentración de iones de sodio disociados está en el rango de 100 mM y 250 mM.
8. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en el que la conductividad de la composición es de aproximadamente 20 mS/cm.
- 35 9. El uso de una composición líquida de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para el almacenamiento, el transporte, o dispensación de termolisina, en el que la termolisina está en forma disociada.

**A**



**B**

