

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 402**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/42** (2006.01)  
**C07K 17/08** (2006.01)  
**A61K 31/13** (2006.01)  
**A61K 31/19** (2006.01)  
**A61K 31/185** (2006.01)  
**A61K 8/97** (2006.01)  
**A61K 8/73** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61Q 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2011 PCT/US2011/021773**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11091084**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2011 E 11735144 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2525828**

54 Título: **Proteasas estabilizadas para su uso en el cuidado de la piel**

30 Prioridad:

**19.01.2010 US 296052 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.01.2017**

73 Titular/es:

**BASF CORPORATION (100.0%)**  
**100 Park Avenue**  
**Florham Park, NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**CHAVAN, MANASI**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 596 402 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**

Proteasas estabilizadas para su uso en el cuidado de la piel

Prioridad

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 61/296.052, presentada el 19 de enero de 2010.

Sumario

10 Se da a conocer una invención que se refiere a sintetizar proteasas inmovilizadas y reticuladas derivadas de plantas para su uso como agentes para el cuidado de la piel. La proteasa estabilizada resultante penetrará mínimamente en la piel debido a su naturaleza inmovilizada. Conservará la actividad debido a su naturaleza reticulada y, en determinadas realizaciones, debido a su estabilización a través de aditivos físicos. La presente invención se refiere en particular a un producto de papaína unida usado en aplicaciones tópicas para la piel.

Antecedentes

15 La actividad de las proteasas es importante en la homeostasis epidérmica. Por tanto, las proteasas tienen diversos beneficios potenciales cuando se aplican a la piel, pero están sometidas a determinadas limitaciones. La papaína es una proteasa potente derivada de la papaya y de otras plantas determinadas. Sin embargo, pierde actividad rápidamente en un estado en disolución. Esto se debe a que la papaína, de manera similar a todas las proteasas, se digiere a sí misma al mismo tiempo que experimenta desnaturalización. Además, pueden encontrarse otras dificultades con los productos de papaína convencionales cuando se usan estos productos de papaína como agentes tópicos para el cuidado de la piel en relación con la penetración en la piel y la irritación de la piel. Es altamente deseable desarrollar productos de proteasa, y más particularmente, un producto de papaína, para su uso en el cuidado de la piel que no tenga tales limitaciones.

20 Answar *et al.* en *Biocatalysis and Biotransformation* 2007, 25(6), págs. 453-458 se refiere a la reticulación de la proteasa bromelaina de tallo y a su uso en la industria textil. El documento WO 92/03543 A1 se refiere a un derivado de acetolactato decarboxilasa (ALDC) producida tratando ALDC con glutaraldehído y a su uso en la fermentación de cerveza. Por otra parte, el documento WO 91/06287 A1, se refiere a microesferas proteicas biodegradables para la liberación *in vivo* de un agente biológicamente activo.

30 Para superar las dificultades mencionadas anteriormente en la técnica convencional, realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención proporcionan un producto de proteasa reticulada estable modificada a través de las técnicas expuestas descritas en el presente documento y, particularmente, un producto de proteasa reticulada estable modificada.

35 Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, con el fin de obtener un producto de papaína reticulada estable, se inmoviliza la papaína en un polímero como, por ejemplo, un carbómero o carbopol en una reacción de reticulación primaria y entonces se realiza posteriormente una reacción de reticulación secundaria mediante la adición de un reactivo de reticulación homobifuncional de bajo peso molecular que es reactivo con amina tal como, por ejemplo, adipimidato de dimetilo (DMA), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), suberimidato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP) y suberato de disuccinimidilo (DSS).

40 En otras realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, se realizan la reacción de reticulación primaria y la reacción de reticulación secundaria para obtener un producto de papaína reticulada estable y, entonces, la papaína reticulada estable se estabiliza adicionalmente usando estabilizadores físicos tales como, por ejemplo, azúcares o polímeros de azúcar. Por ejemplo, puede usarse alginato de sodio como estabilizador físico según realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención.

El producto de papaína estabilizada reticulada anterior todavía puede estabilizarse incluso adicionalmente incluyendo el producto de papaína estabilizada anterior en determinados sistemas conservantes o en una formulación de aceite en agua.

45 Los beneficios del complejo de proteasa (por ejemplo, papaína) inmovilizada, reticulada y estabilizada según realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención incluyen:

- 1) mínima penetración en la piel,
- 2) conservación de actividad proteásica en disolución o forma seca

3) mínima irritación de la piel, y

4) facilidad de formulación

Todavía en otras realizaciones de la presente invención, se describen composiciones cosméticas para el cuidado personal y farmacéuticas que comprenden proteasas estabilizadas.

5 Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras se presentan únicamente para fines de ilustración.

La figura 1 ilustra reacciones de reticulación para formar una proteasa reticulada estable según la presente invención.

10 La figura 2 ilustra un producto de papaína reticulada estable según una realización a modo de ejemplo de la presente invención que ha experimentado las reacciones de reticulación ilustradas en la figura. 1.

La figura 3 ilustra el porcentaje de actividad del día 0 tras almacenar muestras de una papaína estabilizada según una realización a modo de ejemplo de la presente invención a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas.

La figura 4 ilustra el porcentaje de actividad del día 0 tras almacenar las muestras sin DMA a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas.

15 La figura 5 ilustra una curva patrón de papaína sigma

La figura 6(a) ilustra el porcentaje de actividad del día 0 conservada tras almacenar muestras de papaína estabilizada a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas según una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

20 La figura 6(b) ilustra el porcentaje de actividad del día 0 conservada tras almacenar las muestras sin DMA a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas.

La figura 7 es un diagrama que ilustra que no se encontró papaína activa libre en un producto de papaína reticulada estable según una realización a modo de ejemplo de la presente invención.

La figura 8 es un diagrama que ilustra el porcentaje de actividad tras 1 semana a diferentes temperaturas de muestras que contienen el 0,2% de BS3 y muestras de control que no contienen BS3.

25 La figura 9 es un diagrama que ilustra el porcentaje de actividad conservada tras 4 semanas de muestras de papaína estabilizada con y sin alginato al 0,1%.

La figura 10 es una curva patrón de papaína sigma.

La figura 11 es un diagrama que ilustra el efecto del azúcar o polímeros de azúcar sobre la estabilidad de la papaína libre tras 10 días a 25°C y 40°C.

30 La figura 12 es un diagrama que ilustra el porcentaje de actividad conservada tras 2 semanas de papaína al 0,4%.

La figura 13(a) ilustra un producto de papaína reticulada estable que se ha reticulado mediante DMA y se ha hecho reaccionar adicionalmente con alginato de sodio.

La figura 13(b) es un diagrama que ilustra el porcentaje de actividad conservada tras almacenar muestras de DMA al 1% a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas.

35 La figura 13 (c) es un diagrama que ilustra el porcentaje de actividad del día 0 tras almacenar muestras sin DMA a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas.

La figura 14 es un gráfico que ilustra el efecto de DMA sobre la conservación de actividad de papaína unida.

La figura 15 es un diagrama que ilustra la actividad en muestras de papaína unida tras 12 semanas a diferentes temperaturas.

La figura 16 es una curva patrón de papaína sigma.

La figura 17 es un diagrama que ilustra la actividad de papaína unida (con DMA) conservada en la formulación.

La figura 18 es un diagrama que ilustra la actividad de papaína unida (sin DMA) conservada en la formulación.

La figura 19 es un gráfico que ilustra la actividad de papaína unida conservada dentro de de formulaciones

5 La figura 20 es una curva patrón para papaína sigma en la formulación de placebo,

La figura 21 es un diagrama que ilustra la actividad de papaína unida conservada en una formulación en aceite y agua.

Descripción detallada

10 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

15 Aunque pueden usarse métodos y materiales similares a o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, dominará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones. Tal como resultará evidente para un experto en la técnica, las características y realizaciones específicas descritas en el presente documento pueden combinarse con cualquier otra característica o realización.

20 La epidermis está compuesta por varios estratos o capas. La capa más exterior, el estrato córneo, está constituida por células muertas que han migrado hacia fuera a lo largo del transcurso de varios días desde los estratos inferiores. Estas células muertas normalmente se desprenden de la superficie de la piel a través de un proceso denominado descamación epidérmica que estimula el crecimiento de nuevas células a un nivel más profundo. La piel más joven es más eficaz en este proceso que la piel envejecida o dañada. Como resultado, la piel envejecida  
25 tiene un aspecto mate, grueso y menos tonificado. Esto puede agravarse por factores medioambientales, tales como exposición a la luz del sol; influencias hormonales, tales como andrógenos, estrógenos y factor de crecimiento epidérmico; y deficiencias de vitaminas, tales como deficiencias en vitaminas A y D. La actividad proteasa es un factor clave en el proceso de descamación. Por tanto, es deseable la aplicación de proteasas a la piel para efectos cosméticos, tales como antienvjecimiento y alisado de la piel. Sin embargo, se sabe que el uso de proteasas en  
30 aplicaciones cosméticas y otras tiene tres limitaciones principales: inestabilidad, posibilidad de alergenicidad y penetración en la piel.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las proteasas pueden estabilizarse a través de determinadas reacciones de reticulación para formar un copolímero de proteasa-carbómero, también denominado  
35 en el presente documento como proteasa "estabilizada". Tales proteasas estabilizadas comprenden una proteasa reticulada a un carbómero, en las que las aminas primarias de la proteasa están reticuladas a los grupos carboxilo del carbómero y en las que las aminas de la proteasa están reticuladas adicionalmente mediante un agente de reticulación reactivo con amina. En una realización de la invención, la proteasa estabilizada comprende además un estabilizador físico, por ejemplo, un azúcar o polímero de azúcar.

40 También se da a conocer un método de formación de un producto de proteasa estabilizada de este tipo en el que se realiza una reacción de reticulación primaria para reticular las aminas primarias de la proteasa a los grupos carboxilo de un carbómero y se realiza una reacción de reticulación secundaria a través de un agente de reticulación reactivo con amina.

### Proteasas

45 Las proteasas son enzimas que catalizan la ruptura de las proteínas. Las proteasas, que son proteínas ellas mismas, tienen tendencia a experimentar autodegradación y son de naturaleza inestable. Esta naturaleza proteica también las convierte en alergénicas. Además, debido a su capacidad para degradar proteínas, pueden penetrar en las capas más profundas de la epidermis y producir daño en los estratos subyacentes. Las proteasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen papaína, ficina, bromelaína y actinidaína.

La ficina es una sulfhidrilo proteasa no específica aislada del látex del higo, el fruto del árbol del Ficus. La ficina se

5 obtiene lo más comúnmente de *Ficus carica* y *Ficus glabrata*. Sin embargo, la ficina también puede aislarse de los frutos de otras especies de *Ficus*, tales como *Ficus elastica* y *Ficus insipida*. La bromelaina es una sulfhidrilo proteasa aislada del tallo y/o el fruto de la piña (*Ananas comosus*). La actinidaina, también conocida como actinidina es una cisteína proteasa obtenida del fruto del kiwi (*Actinidia deliciosa*). La papaína es una cisteína proteasa obtenida de la papaya (*Carica papaya*) y la papaya de montaña (*Vasconcellea cundinamarcensis*), lo más a menudo del látex del fruto verde, inmaduro. Las proteasas están presentes en una concentración de entre aproximadamente el 0,1% y el 5% en peso.

#### Carbómeros

10 En primer lugar se inmoviliza la proteasa en un carbómero. Los carbómeros son homopolímeros de ácido acrílico que tienen un alto peso molecular que se reticula con cualquiera de varios alil éteres de polialcohol (por ejemplo, alil éter de pentaeritritol, alil éter de sacarosa o alil éter de propileno). Ejemplos de carbómeros adecuados son Carbómero 910, Carbómero 934, Carbómero 934p, Carbómero 940 y Carbómero 941, en los que el sufijo numérico indica el peso molecular promedio de las cadenas poliméricas. Tal como se usa en el presente documento, una proteasa "inmovilizada" o proteasa "unida" se refiere a una proteasa que se ha hecho reaccionar con el carbómero a través de la reacción de reticulación primaria. Agentes de reticulación adecuados para esta reacción de reticulación primaria son reactivos que pueden acoplar grupos carboxilo a aminas primarias. Un ejemplo de un reactivo de reticulación adecuado es la carbodiimida soluble en agua 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida. La EDC es un agente de reticulación de longitud cero usado para acoplar grupos carboxilo a aminas primarias. La EDC reacciona con grupos de ácido carboxílico para dar grupos O-acilisourea, que forman reticulaciones tras la reacción con grupos amina libres. La EDC es un agente de reticulación primario en esta realización que se convierte en una urea disustituida durante el transcurso de la reacción. La NHS es un éster de ácido y un catalizador que aumenta la velocidad de reticulación y permanece sin cambios durante la reacción de reticulación.

#### Agentes de reticulación químicos

25 Una vez inmovilizada en el carbómero, se hace reaccionar la proteasa inmovilizada con un agente de reticulación reactivo con amina en una reacción de reticulación secundaria para formar un copolímero de proteasa-carbómero, también denominado en el presente documento "proteasa estabilizada". El reactivo de reticulación es preferiblemente un agente de reticulación de bajo peso molecular de manera que el agente de reticulación reaccionará completamente o reaccionará casi completamente en la reacción de reticulación secundaria. Los ejemplos de agentes de reticulación adecuados que pueden usarse incluyen agentes de reticulación de imidoéster tales como adipimidato de dimetilo (DMA), pimelimidato de dimetilo (DMP), suberimidato de dimetilo (DMS), 3,3-ditiobis de dimetilo. Los agentes de reticulación reactivos con amina pueden facilitarse en diversas concentraciones que oscilan entre aproximadamente el 0,05% y aproximadamente el 5% en peso, preferiblemente entre aproximadamente el 1% y el 5%. En determinadas realizaciones, se utiliza DMA.

#### Estabilizadores físicos

35 Tras la reticulación química, se estabiliza además opcionalmente la proteasa inmovilizada y reticulada con un estabilizador físico, por ejemplo, azúcar o polímeros de azúcar. Ejemplos de azúcares o polímeros de azúcar adecuados son alginato de sodio, trehalosa, manitol, glicerol y xantana. En una realización, se utiliza alginato de sodio. Tales estabilizadores físicos pueden incluirse en concentraciones de entre aproximadamente el 0,1% y el 5% en peso.

40 En la figura 1 se muestra una ilustración de reacción de reticulación para formar una realización de las proteasas estabilizadas de la presente invención. En la figura 2 se muestra una ilustración de un producto de papaína estabilizada.

#### Aplicaciones/formulaciones

45 Las proteasas estabilizadas de la presente invención tienen mínima penetración en la piel, conservan la actividad proteásica en disolución o forma seca, tienen mínima irritación de la piel y son relativamente fáciles de proporcionar en una formulación. Por consiguiente, las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención proporcionan productos de proteasa más estables y mucho más seguros en comparación con los productos de proteasa de la técnica convencional, particularmente realizaciones de productos de papaína estabilizada.

50 Las proteasas estabilizadas son adecuadas para su uso en formulaciones cosméticas y para el cuidado personal, por ejemplo, preparaciones exfoliantes, preparaciones anti-arrugas y/o antienvjecimiento, aditivos de baño, preparaciones para el cuidado del cabello, jabones líquidos y sólidos, disoluciones de limpieza, toallitas limpiadoras húmedas, aceites o polvos, preparaciones antiacné. Las proteasas estabilizadas son particularmente adecuadas para tratar cosméticamente la piel seca, envejecida o dañada aplicando una o más de las proteasas estabilizadas de la presente invención a piel seca, envejecida o dañada que necesita tratamiento cosmético.

Las formulaciones cosméticas y/o para el cuidado personal pueden estar en forma, por ejemplo, de una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua, una formulación alcohólica o que contiene alcohol, una dispersión vesicular de un lípido anfílico no iónico o iónico, o un gel. Las formulaciones cosméticas y/o para el cuidado personal a modo de ejemplo comprenden entre aproximadamente el 0,5% y el 5% de proteasa estabilizada, en peso, preferiblemente entre aproximadamente el 1% y el 3%.

Las proteasas estabilizadas de la presente invención también son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas, por ejemplo, aplicaciones de desbridamiento. El desbridamiento es la eliminación de tejido muerto o dañado de heridas, por ejemplo, heridas ulcerosas o quemaduras con el fin de ayudar en su curación. En una realización de la invención, se aplica una o más de las proteasas estabilizadas de la presente invención a heridas o quemaduras de la piel que necesitan desbridamiento. Las formulaciones y productos que comprenden proteasas estabilizadas para el tratamiento cosmético de heridas o quemaduras incluyen, a modo de ejemplo, vendajes/apósitos, parches, disoluciones de lavado, pomadas o geles, o tejidos sintéticos. En determinadas realizaciones, las composiciones de desbridamiento, por ejemplo, vendajes, apósitos o parches, pueden incluir opcionalmente agentes antimicrobianos. Para las aplicaciones de desbridamiento, la cantidad de proteasa estabilizada incluida en las composiciones farmacéuticas será una cantidad que desbride eficazmente el tejido necrótico y licue la pus en las heridas, y que efectúe la eliminación en un tiempo razonable (por ejemplo, a lo largo de un periodo de siete días) sustancialmente de todos estos materiales.

Además de las aplicaciones para el cuidado de la piel, las proteasas estabilizadas de la presente invención también pueden ser adecuadas en otras aplicaciones conocidas en la técnica en las que se desearía una forma estable de una proteasa. Una aplicación a modo de ejemplo son las composiciones para el cuidado bucal.

Las composiciones tópicas que comprende proteasas estabilizadas pueden comprender además una variedad de otros componentes que se usan de manera conveniente en cosmética, cuidado personal o formulaciones farmacéuticas, siempre que no alteren de manera inaceptable los beneficios de la invención. Los ejemplos de clases de componentes convencionales opcionales incluyen fragancias, pigmentos, agentes colorantes/de tinción, aceites esenciales, astringentes, agentes antienvjecimiento, agentes antiacné, agentes antiapelmazamiento, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, aglutinantes, agentes de ajuste del pH, blanqueantes de la piel y agentes iluminadores, agentes de acondicionamiento de la piel, protectores solares, conservantes, agentes antiinflamatorios, hidratantes, espesantes y vitaminas.

Para determinadas realizaciones de aplicaciones cosméticas, para el cuidado personal y/o farmacéuticas, es deseable incluir además un sistema conservante con la proteasa estabilizada. Se conocen enzimas que desnaturalizan en condiciones rigurosas como altas temperaturas y la presencia de productos químicos incompatibles como fuertes emulsionantes. Dos sistemas conservantes de ejemplo adecuados para su uso con proteínas estabilizadas y particularmente adecuados para papaína estabilizada, son:

(a) Fenoxietanol + ácido benzoico

(b) Diocida (combinación de fenoxietanol + caprilglicol + hexilenglicol)

## Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos.

### Ejemplo 1

Se produjo un producto de papaína estable que conserva su actividad proteásica y es más seguro que productos de papaína convencionales que contienen papaína libre llevando a cabo una reacción de reticulación primaria en la que se reticuló papaína al 1% con Carbopol usando carbodiimida, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), junto con N-hidroxisulfosuccinimida (NHS). A continuación, se llevó a cabo una reacción de reticulación secundaria en la que se hace reaccionar la papaína inmovilizada con adipimidato de dimetilo (DMA) para reticular adicionalmente la papaína reticulada para así formar un producto de papaína reticulada estable. Se proporcionó DMA a una concentración del 1% y se proporcionó la papaína a una concentración del 1% en peso.

Se realizaron tres (3) lotes de laboratorio experimentales del producto de papaína estabilizada anterior para determinar el efecto que tiene el 1% de DMA sobre la actividad/estabilidad enzimática de la papaína reticulada primaria a lo largo de un periodo de almacenamiento de más de 12 semanas. En la tabla 1 se exponen las condiciones de reacción para realizar los experimentos.

Tabla 1

Protocolo de ensayo usando el kit E6639 EnzChek® de Invitrogen para determinar la actividad enzimática Curva patrón de papaína			
N.º de patrón	Disolución madre (U/ml)	Disolución de reserva (1 U/ml)	Tampón de ensayo
1	1	1000	0
2	0,5	500	500
3	0,25	250	750
4	0,1	100	900
5	0,05	50	950
6	0,01	10	990
7	0,005	5	995
8	0	0	1000
Preparar disolución madre de 1 unidad/ml de papaína 10 mg de papaína de Sigma 25 ml dl 1X tampón de digestión			
Requisito de material y tampón:			
Bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3 1x Tampón de digestión: PBS pH 6 + 50 ul de TX-100 Disolución de reserva 1 mg/ml de caseína de BODIPY TRX = 1 vial de sustrato y disolver en 0,2 ml de tampón de bicarbonato Disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY: Añadir 0,2 ml de disolución de reserva de sustrato en 19,8 ml de tampón de digestión en un frasco de 50 ml			
Ensayo:	20 ul de patrón/muestra 80 ul de 1X tampón de digestión 100 ul de disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY		
Muestras:	50 ul de papaína unida mezclados con 150 ul de 1X tampón de digestión que contiene Triton X-100 al 0,1%		
Procedimiento:	Incubar la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación moderada. Proteger la placa de la luz. Leer la fluorescencia en un lector de microplacas de fluorescencia. Usar filtros de fluoresceína convencionales con excitación a 530/25 nm, emisión a 620/40 nm.		

5 A continuación en las tablas 2(a)-5(b) se exponen los resultados de los tres lotes de laboratorio independientes para determinar la actividad conservada de papaína inmovilizada con DMA al 1% y sin DMA a diversas temperaturas a lo largo de un periodo de 12 semanas. La tabla 2(a) representa el porcentaje de actividad conservada de papaína inmovilizada unida en las muestras experimentales que también contienen DMA al 1%. La tabla 2(b) representa el porcentaje de actividad conservada de papaína inmovilizada en las muestras de control que no incluyen DMA. Las muestras experimentales y las muestras de control eran esencialmente las mismas excepto porque las muestras de control no contenían nada de DMA.

Tabla 2(a) - Papaína inmovilizada reticulada con DMA al 1%

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
	100	100	100	100
2 semanas	103,927	106,806	92,670	75,654
4 semanas	101,832	98,168	69,372	26,70
6 semanas	97,906	95,812	55,236	13,089
0 semanas	96,073	92,670	36,911	2,356
12 semanas	95,812	84,296	12,923	2,068

10

Tabla 2(b) - Papaína inmovilizada (sin DMA) - Control

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	96,419	68,286	53,708	25,064
4 semanas	91,049	57,545	47,826	8,440
6 semanas	90,537	45,013	26,087	2,558
8 semanas	85,166	27,877	12,788	0,256
12 semanas	78,772	21,043	6,115	0,305

## ES 2 596 402 T3

Tabla 3(a) - Papaína inmovilizada reticulada con DMA al 1%

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	107,320	110,000	87,530	65,430
4 semanas	95,620	92,650	65,430	29,76
6 semanas	91,420	87,210	56,540	10,430
8 semanas	87,240	84,320	30,120	1,340
12 semanas	85,350	80,460	10,870	1,000

Tabla 3(b) - Papaína inmovilizada (sin DMA) - Control

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	92,340	63,450	62,870	20,870
4 semanas	88,010	53,450	44,620	5,670
6 semanas	84,320	44,670	28,980	1,650
8 semanas	81,760	22,970	10,960	0,430
12 semanas	72,350	17,650	4,300	0,010

Tabla 4(a) -Papaína inmovilizada reticulada con DMA al 1%

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	99,000	99,980	92,670	68,520
4 semanas	97,620	96,210	62,650	22,01
6 semanas	96,420	92,510	52,980	10,650
8 semanas	90,610	82,100	31,000	2,420
12 semanas	88,010	80,110	10,650	0,890

Tabla 4(b)- Papaína inmovilizada (sin DMA) - Control

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	98,870	71,820	50,980	27,870
4 semanas	86,340	52,340	41,620	5,750
6 semanas	80,730	40,210	22,320	1,230
8 semanas	81,530	20,410	11,876	0,910
12 semanas	75,610	15,620	3,110	0,030

- 5 Tabla 5(a) - Valor medio para el % de actividad conservada de papaína inmovilizada reticulada con DMA al 1% del lote 1 (tabla 3), lote 2 (tabla 4) y lote 3 (tabla 5)

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	103,4	105,6	91,0	69,9
4 semanas	98,4	95,7	65,8	26,2
6 semanas	95,2	91,8	54,9	11,4
8 semanas	91,3	86,4	32,7	2,0
12 semanas	89,7	81,6	11,5	1,3

- Tabla 5(b) -Valor medio para el % de actividad conservada de papaína inmovilizada (sin DMA) del lote 1 (tabla 3), lote 2 (tabla 4) y lote 3 (tabla 5)

Tiempo	4°C	25°C	40°C	50°C
0 semanas	100	100	100	100
2 semanas	95,88	67,85	55,85	55,85
4 semanas	88,47	54,44	44,69	44,69
6 semanas	85,20	43,30	25,80	25,80
8 semanas	82,82	23,75	11,87	11,87
12 semanas	75,58	18,10	4,51	4,51

Tal como puede observarse a partir de los resultados de las tablas 2(a)-5(b), la actividad de papaína inmovilizada que se reticuló con DMA al 1% en las muestras experimentales fue significativamente mayor a lo largo de una variedad de temperaturas que la actividad de papaína inmovilizada en las muestras de control que no se hizo reaccionar con DMA. Por consiguiente, la papaína que ha experimentado una reacción de reticulación primaria para reticular la papaína con un carbómero y después ha experimentado una reacción de reticulación secundaria con DMA al 1% es significativamente más estable que muestras de control de papaína que ha experimentado la reacción de reticulación primaria pero no ha experimentado una reacción de reticulación secundaria con DMA. Además, las figuras 3 y 4 ilustran los resultados de las tablas 2(a)-5(b) de que la actividad de papaína inmovilizada que se ha reticulado con DMA al 1% es significativamente mayor a lo largo de una variedad de temperaturas que la actividad de papaína inmovilizada en las muestras de control que no se ha hecho reaccionar con DMA.

Tal como se expone a continuación en las tablas 6 y 7, se determinó la actividad de papaína en las muestras experimentales y las muestras de control basándose en el cambio de fluorescencia por muestra unitaria de la papaína inmovilizada. Se desarrolló una curva patrón de la actividad de papaína de Sigma tal como se muestra en la figura 5 para ayudar en la cuantificación de la actividad de papaína inmovilizada reticulada con DMA al 1% según el presente ejemplo. Tal como se indicó anteriormente, se usó un kit de ensayo de proteasa EnzChek® (E-6639) para obtener la curva patrón y el cambio de fluorescencia por muestra unitaria del experimento de la presente invención.

Tabla 6 - Valores de fluorescencia para papaína inmovilizada con DMA al 1% y sin DMA (control)

Muestras de papaína unida con o sin DMA al 1% (muestras de 12 semanas)								
4°C								
1	LP-DMA al 1%	1:8	5674	5432	5876	5660,7	4415	0,458
2	LP-Control	1:8	4598	5165	5120	4961,0	3715	0,385
25°C								
1	LP-DMA al 1%	1:8	5432	4987	4976	5131,7	3886	0,403
2	LP-Control	1:8	2204	2252	2359	2271,7	1026	0,103
40°C								
1	LP-DMA al 1%	1:8	1903	1885	1849	1879,0	633	0,062
2	LP-Control	1:8	1580	1571	1575	1575,3	329	0,030
50°C								
1	LP-DMA al 1%	1:8	1334	1345	1474	1384,3	138	0,010
2	LP-Control	1:8	1274	1315	1324	1304,3	58	0,001

Tabla 7- Actividad de papaína inmovilizada al 1% con DMA al 1% y papaína inmovilizada sin DMA (control) medida en unidades/ml.

	Actividad, unidades/ml	Unidades/ml			
0 semanas	LP-DMA al 1%	3,82	3,82	3,82	3,82
datos 041608	LP-Control	4,91	4,91	4,91	4,91
		4°C	25°C	40°C	50°C
2 semanas	LP-DMA al 1%	3,97	4,08	3,54	2,89
datos 043008	LP-Control	3,77	2,67	2,1	0,98
4 semanas	LP-DMA al 1%	3,89	3,75	2,65	1,02
datos 051408	LP-Control	3,56	2,25	1,87	0,33
6 semanas	LP-DMA al 1%	3,74	3,66	2,11	0,5
datos 052808	LP-Control	3,54	1,76	1,02	0,1
8 semanas	LP-DMA al 1%	3,67	3,54	1,41	0,09
datos 061108	LP-Control	3,33	1,09	0,5	0,01
12 semanas	LP-DMA al 1%	3,66	3,22	0,49	0,08
datos 070208	LP-Control	3,08	0,82	0,24	0,01

En otros experimentos, se almacenó papaína al 1% reticulada con DMA al 1% y se almacenó papaína al 1% reticulada sin DMA a las temperaturas de 4°C, 25°C y 45°C a lo largo de un periodo de 12 semanas para determinar la estabilidad de estas muestras de papaína a estas temperaturas. Los resultados de este experimento se obtuvieron mediante un ensayo de la actividad de papaína usando el kit de ensayo EnzChek® de Invitrogen, N=3.

Tal como se muestra en las figuras 6(a)-6(b), la reticulación de papaína inmovilizada con DMA mejoró significativamente la estabilidad del producto a 25°C y 45°C en comparación con la muestra de control en la que no

5 se almacenó papaína unida con DMA. La figura 6(a) ilustra el porcentaje de actividad conservada tras almacenar muestras durante hasta 12 semanas que contenían papaína unida reticulada con DMA. La figura 6(b) ilustra muestras de control que se almacenaron durante hasta 12 semanas que contenían papaína unida sin DMA. Se observa además que tal como se ilustra en la figura 6(a), se determinó que el producto de papaína unida reticulada con DMA conserva más de aproximadamente el 80% de actividad a 4°C y 25°C durante 12 semanas y aproximadamente el 50% a 45°C.

10 En todavía otros experimentos, tal como se muestra en la figura 7, se llevó a cabo una determinación de papaína activa libre en papaína estabilizada. Los resultados del experimento fueron que se determinó que no se encontró nada de papaína activa libre en la papaína que se había reticulado con EDC/NHS en una reacción de reticulación primaria y después reticulado adicionalmente con DMA al 1% en una reacción de reticulación secundaria según una realización a modo de ejemplo de la presente invención. Por otro lado, había actividad significativa de papaína libre en la papaína de las muestras de control que no estaban reticuladas.

**Ejemplo 2**

15 En el ejemplo 2, en lugar de usarse DMA como agente de reticulación secundario, se usó el 0,2% del agente de reticulación BS3 para reticular el producto de papaína inmovilizada en una reacción de reticulación secundaria. El protocolo, los reactantes, las condiciones de reacción y los resultados para determinar el porcentaje de actividad de las muestras experimentales de papaína inmovilizada almacenadas con BS3 al 0,2% y las muestras de control de papaína inmovilizada almacenadas sin BS3 se ilustran en las tablas 8-10 y se comentan a continuación.

Tabla 8

Protocolo de ensayo usando el kit E6639 EnzChek de Invitrogen para determinar la actividad enzimática				
Curva patrón de papaína				
n.º de patrón	Disolución madre (U/ml)	Disolución de reserva (1 U/ml)	Tampón de ensayo	
1	1	1000	0	
2	0,5	500	500	
3	0,25	250	750	
4	0,1	100	900	
5	0,05	50	950	
6	0,01	10	990	
7	0,005	5	995	
8	0	0	1000	
Preparar disolución madre de 1 unidad/ml de papaína				
10 mg de papaína de Sigma				
25 ml dl 1X tampón de digestión				
Requisito de material y tampón:				
Bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3				
1x Tampón de digestión: PBS pH 6 + 50 ul de TX-100				
Disolución de reserva 1 mg/ml de caseína de BODIPY TRX = 1 vial de sustrato y disolver en 0,2 ml de tampón de bicarbonato				
Disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY:				
Añadir 0,2 ml de disolución de reserva de sustrato en 19,8 ml de tampón de digestión en un frasco de 50 ml				
Ensayo:				
20 ul de patrón/muestra				
80 ul de 1X tampón de digestión				
100 ul de disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY				
Muestras: 50 ul de papaína unida mezclados con 150 ul de 1X tampón de digestión que contiene Triton X-100 al 0,1%				
Procedimiento:				
Incubar la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación moderada. Proteger la placa de la luz. Leer la fluorescencia en un lector de microplacas de fluorescencia. Usar filtros de fluorescencia convencionales con excitación a 530/25 nm, emisión a 620/40 nm.				
N.º de tubo	ID de muestra, muestras de papaína unida	Filtro de dilución	Muestra	1X tampón de

Protocolo de ensayo usando el kit E6639 EnzChek de Invitrogen para determinar la actividad enzimática				
				digestión
1	LP-BS3 4°C	1:4	50	150
2	LP-BS3 25°C	1:4	50	150
3	LP-BS3 40°C	1:4	50	150
4	LP-BS3 50°C	1:4	50	150
5	LP-sin BS3 4°C	1:4	50	150
6	LP-sin BS3 25°C	1:4	50	150
7	LP-sin BS3 40°C	1:4	50	150
8	LP-sin BS3 50°C	1:4	50	150
		1:4	50	150

Se prepararon muestras de papaína unida con o sin BS3 al 0,2%

Tabla 9

N.º de tubo	ID de muestra	Factor de dilución	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	promedio-negativo	unidades/ml	unidades/ml
1	LP - BS3 4°C	1:4	10954	10883	12916	11584,3	10231	1,034	4,14
2	LP - BS3 25°C	1:4	12196	12865	12959	12673,3	11320	1,156	4,62
3	LP - BS3 40°C	1:4	13135	13636	14267	13679,3	12326	1,268	5,07
4	LP - BS3 50°C	1:4	11009	11025	11031	11021,7	9668	0,971	3,89
5	LP - sin BS3 4°C	1:4	8174	19586	12	9257,3	7904	0,775	3,10
6	LP - sin BS3 25°C	1:4	5345	12494	13	5950,7	4597	0,406	1,62
7	LP - sin BS3 40°C	1:4	3191	7654	12	3619,0	2265	0,146	0,58
8	LP - sin BS3 50°C	1:4	2383	5583	14	2660,0	1306	0,039	0,16

Tabla 10

Actividad conservada tras 1 semana - % de actividad a 4°C	Sin BS3	BS3 al 0,2%
4°C	99,957	99,912
25°C	52,389	111,643
40°C	18,847	122,479
50°C	5,052	93,851

5 Tal como puede verse a partir de los resultados de la tabla 10 y la figura 8, la actividad de papaína al 1% inmovilizada que se ha reticulado adicionalmente con BS3 al 0,2% fue significativamente mayor a lo largo de una variedad de temperaturas que la actividad de papaína inmovilizada en las muestras de control que no se había hecho reaccionar con BS3.

### Ejemplo 3

10 En este ejemplo, se combinaron papaína estabilizada al 1% y alginato de sodio al 0,1%. El protocolo, los reactantes, las condiciones de reacción y los resultados para determinar el % de actividad de muestras experimentales de papaína estabilizada almacenada con alginato de sodio al 0,1% y muestras de control de producto de papaína estabilizada almacenadas sin alginato de sodio tal como se comenta a continuación.

Tabla 11

Curva patrón de papaína	
Preparar disolución madre de 5 unidades/ml de papaína	
10 mg de papaína de Sigma	5 ml dl 1X tampón de digestión

ES 2 596 402 T3

Curva patrón de papaína	
Requisito de material y tampón:	
1x tampón de ensayo: borato 50 mM, pH 8,5	
Sustrato: caseína succinilada 2 mg/ml en 1X tampón de ensayo, disolver 1 vial (10 mg) en 5 ml de tampón de ensayo. Disolución de trabajo de TNBSA: 100 ul de disolución de reserva de TNBSA con 14,9 ml de tampón de ensayo	
Ensayo:	50 ul de patrón/muestra
	100 ul de sustrato (2 mg/ml), incubar la placa durante 20 min a TA
	50 ul de disolución de TNBSA, incubar la placa durante 20 min a temp. ambiente
	Leer la absorbancia a 450 nm
Muestras sometidas a prueba (muestras de papaína unida de 4 semanas – preparadas con una concentración de papaína 101607 al 1%)	
Sin tratamiento a 4°C Alginato al 0,1% a 4°C	
Sin tratamiento a 25°C Alginato al 0,1% a 25°C	
Sin tratamiento 50°C Alginato al 0,1% a 50°C	

Tabla 12

patrón de papaína	valor 1	valor 2	promedio	negativo	absorbancia prom-neg a 450 nm
3	1,636	1,677	1,6565	0,676	0,9805
2	1,161	1,16	1,1605	0,427	0,7335
1	0,554	0,55	0,552	0,232	0,32
0,5	0,245	0,245	0,245	0,12	0,125
0,25	0,123	0,127	0,125	0,071	0,054
0,1	0,073	0,075	0,074	0,049	0,025
0,05	0,06	0,06	0,06	0,042	0,018
0	0,054	0,061	0,0575	0,031	0,0265

Tabla 13

muestras sometidas a prueba (muestras de papaína unida de 4 semanas – preparadas con concentración de papaína 101607 al 1%)

	valor 1	valor 2	promedio	negativo	prom-neg	unidades/ml
Sin tratamiento a 4°C	1,455	1,15	1,3025	0,7145	0,588	1,75493954 6
Alginato al 0,1% a 4°C	1,328	1,329	1,3285	0,6123	0,7162	2,13299911 5
Sin tratamiento a 25°C	0,758	0,629	0,6935	0,5605	0,133	0,41315246 2
Alginato al 0,1% a 25°C	0,936	0,9	0,918	0,563	0,355	1,0678266
Sin tratamiento a 50°C	0,691	0,778	0,7345	0,734	0,0005	0,02241226 8
Alginato al	0,791	0,746	0,7685	0,6776	0,0909	0,28900029 5

## ES 2 596 402 T3

muestras sometidas a prueba (muestras de papaína unida de 4 semanas – preparadas con concentración de papaína 101607 al 1%)

0,1% a  
50°C

	semana 0		semana 1		% de actividad de la semana 0	
	unidades/ml	4°C	unidades/ml	50°C	semana 0-4°C	semana 0-50°C
Sin tratamiento	2,690	2,292	0,777	0,143	85,22	5,31
alginato	2,795	2,581	1,546	0,986	92,36	35,26
	semana 2		semana 3		% de actividad de la semana 0	
	unidades/ml	4°C	unidades/ml	50°C	semana 2-4°C	semana 2-50°C
Sin tratamiento	2,690	2,113	0,673	0,032	78,56	1,2
alginato	2,795	2,550	1,258	0,894	91,23	32
	semana 3		semana 4		% de actividad de la semana 0	
	unidades/ml	4°C	unidades/ml	50°C	semana 3-4°C	semana 3-50°C
Sin tratamiento	2,6902	1,89	0,60	0,03	70,24	1,03
alginato	2,7950	2,24	1,13	0,59	80,23	21,01
	semana 4		semana 4		% de actividad de la semana 0	
	unidades/ml	4°C	unidades/ml	50°C	semana 4-4°C	semana 4-50°C
Sin tratamiento	2,690	1,7549	0,4132	0,0224	65,2394	0,8332
alginato	2,795	2,1330	1,0678	0,2890	76,3148	10,3399
	% de actividad de la semana 0		% de actividad de la semana 0		% de actividad de la semana 0	
	semana 4-4°C	semana 4-25°C	semana 4-50°C	semana 4-4°C	semana 4-25°C	semana 4-50°C
Sin tratamiento	65,239	15,359	0,833			
Alginato al 0,1%	76,315	38,205	10,340			

5 Tal como puede observarse a partir de los resultados de tabla 13, la actividad de papaína estabilizada que se almacenó con alginato de sodio al 0,1% es significativamente mayor a lo largo de una variedad de temperaturas a lo largo de 4 semanas que la actividad de papaína estabilizada en las muestras de control que no se almacenaron con alginato de sodio. Por consiguiente, la papaína unida que se hace reaccionar con alginato de sodio al 0,1% es significativamente más estable que las muestras de control de papaína mencionadas anteriormente que no incluyen alginato de sodio. Además, la figura 9 ilustra los resultados de tabla 13 de que la actividad de papaína estabilizada con alginato de sodio fue significativamente mayor a lo largo de una variedad de temperaturas a lo largo de 4 semanas que la actividad de papaína reticulada en las muestras de control que no incluyeron alginato de sodio.

10 Además, tal como se muestra en la figura 10, se desarrolló una curva patrón de la actividad de papaína de Sigma usando absorbancia frente a unidades/ml para ayudar en la cuantificación de la actividad de papaína al 1% unida junto con alginato de sodio al 0,1%.

15 En otros experimentos, tal como se muestra en la figura 11, se llevó a cabo el efecto del azúcar y polímeros de azúcar sobre la estabilidad de la papaína libre tras días a 25°C y 40°C. El azúcar o polímeros de azúcar incluidos fueron alginato de sodio al 0,1%, trehalosa al 5%, manitol al 5%, glicerol al 5%, goma xantana al 0,1%, HA al 0,1%, sacarosa al 5%, sorbitol al 5% y un control sin azúcar. A partir de los resultados se observa que se encontró que alginato de sodio al 0,1% tenía un efecto estabilizante sobre papaína libre. Este efecto estabilizante de alginato de sodio al 0,1% también se observó con la papaína estabilizada de la presente invención.

20 En todavía otros experimentos, tal como se muestra en la figura 12, se determinó el porcentaje de la actividad conservada tras 2 semanas de papaína estabilizada preparada con papaína al 0,4%. En algunas muestras de estos experimentos, se trató la papaína unida con alginato de sodio, en algunas muestras se trató la papaína unida con anhídrido, en algunas muestras se trató la papaína unida con anhídrido y alginato de sodio y en algunas muestras

no se trató la papaína unida en absoluto con nada de lo anterior. Tal como puede deducirse a partir de la figura 12, las muestras que se trataron tanto con alginato de sodio como con anhídrido tenían el mayor % de actividad conservada tras cada una de las dos semanas y las muestras que no se trataron en absoluto tenían el menor % de actividad conservada tras cada una de las dos semanas.

5 **Ejemplo 4**

En ejemplo 4, se hizo reaccionar papaína inmovilizada con DMA al 1% para la reticulación secundaria y con alginato de sodio al 0,1% para la estabilidad adicional y se incluyó como parte de un sistema conservante que comprendía fenoxietanol al 1,2% + ácido benzoico al 0,2%. El protocolo, los reactantes, las condiciones de reacción y los resultados para determinar el % de actividad de muestras experimentales de papaína estabilizada según una realización de la presente invención y muestras de control de un producto de papaína unida (sin DMA o alginato de sodio) se muestran en la tabla 14 y se comentan a continuación.

Tabla 14

Protocolo de ensayo usando el kit E6639 EnzChek de Invitrogen para determinar la actividad enzimática  
Curva patrón de papaína

n.º de patrón	Disolución madre (U/ml)	Disolución de reserva (1 U/ml)	Tampón de ensayo
1	1	1000	0
2	0,5	500	500
3	0,25	250	750
4	0,1	100	900
5	0,05	50	950
6	0,01	10	990
7	0,005	5	995
8	0	0	1000

Preparar disolución madre de 1 unidad/ml de papaína

10 mg de papaína de Sigma

15 25 ml dl 1X tampón de digestión

Requisito de material y tampón:

Bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,3

1x Tampón de digestión: PBS pH 6 + 50 ul de TX-100

20 Disolución de reserva 1 mg/ml de caseína de BODIPY TRX = 1 vial de sustrato y disolver en 0,2 ml de tampón de bicarbonato

Disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY:

Añadir 0,2 ml de disolución de reserva de sustrato en 19,8 ml de tampón de digestión en un frasco de 50 ml

Ensayo: 20 ul de patrón/muestra

80 ul de 1X tampón de digestión

25 100 ul de disolución de trabajo 10 ug/ml de caseína de BODIPY

Las muestras sometidas a prueba contienen	muestras de DMA al 1% papaína al 1% 600 (ESP) DMA al 1% alginato al 0,1% fenoxietanol al 1,2% ácido benzoico al 0,2%	control papaína al 1% 600 (ESP) sin DMA alginato al 0,1% fenoxietanol al 1,2% ácido benzoico al 0,2%
---	---	---

Muestras: 25 ul de papaína unida mezclados con 150 ul de 1X tampón de digestión que contiene Triton X-100 al 0,1%

# ES 2 596 402 T3

Procedimiento:

Incubar la placa a temperatura ambiente durante una hora con agitación moderada. Proteger la placa de la luz. Leer la fluorescencia en un lector de microplacas de fluorescencia. Usar filtros de fluoresceína convencionales con excitación a 590/25 nm, emisión a 620/40 a nm.

5

Tabla 15

Muestras de papaína unida con conc. variable de otro agente de reticulación (muestras de 12 semanas)				
4°C				
1	LP - DMA al 1%	1:8	25	175
2	LP-control	1:8	25	175
25°C				
1	LP - DMA al 1%	1:8	25	175
2	LP-control	1:8	25	175
45°C				
1	LP - DMA al 1%	1:8	25	175
2	LP-control	1:8	25	175

Muestras de papaína unida con o sin DMA al 1% (muestras de 12 semanas)

4°C									
1	LP - DMA al 1%	1:8	5321	5467	5562	5450,0	4223	0,580	4,64
2	LP-control	1:8	4578	4879	5098	4851,7	3625	0,485	3,88
25°C									
1	LP - DMA al 1%	1:8	5098	5291	5120	5169,7	3943	0,535	4,28
2	LP-control	1:8	2789	2908	2871	2856,0	1629	0,169	1,35
45°C									
1	LP - DMA al 1%	1:8	2987	2871	3091	2983,0	1756	0,189	1,51
2	LP-control	1:8	1765	1775	1879	1806,3	579	0,002	0,02
datos de 12 semanas									
			4°C	25°C	45°C				
LP - DMA al 1%			4,638	4,283	1,511				
LP-control			3,880	1,350	0,019				
			4°C	25°C	45°C				
actividad, unidades/ml									
datos de 0 semanas			4,87	4,87	4,87				
LP-control			4,61	4,61	4,61				
datos de 2 semanas			5,01	5,25	4,31				
LP-control			4,81	2,67	2,1				
datos de 4 semanas			5,12	4,98	3,11				
LP-control			4,67	2,01	1,87				
datos de 6 semanas			4,98	4,61	2,31				
LP-control			4,18	1,76	1,02				
datos de 8 semanas			4,81	4,44	1,98				
LP-control			4,01	1,35	0,5				
datos de 12 semanas			4,64	4,28	1,51				
LP-control			3,88	1,35	0,02				
%									
de actividad conservada tras almacenamiento									
			4°C	25°C	45°C				
datos de 2 semanas			102,87	107,80	88,50				
LP-control			104,34	57,92	45,55				
datos de 4 semanas			105,13	102,26	63,86				
LP-control			101,30	43,60	40,56				
datos de 6 semanas			102,26	94,66	47,43				
LP-control			90,67	38,18	22,13				

## ES 2 596 402 T3

Muestras de papaína unida con o sin DMA al 1% (muestras de 12 semanas)				
datos de 8 semanas	LP - DMA al 1%	98,77	91,17	40,66
	LP-control	86,98	29,28	10,85
datos de 12 semanas	LP - DMA al 1%	95,24	87,94	31,02
	LP-control	84,16	29,28	0,43

5 Tal como se indicó anteriormente, las muestras experimentales según una realización a modo de ejemplo de la presente invención incluyen DMA al 1%, papaína al 1% 600 (ESP), alginato de sodio al 0,1%, fenoxietanol al 1,2 + ácido benzoico al 0,2%. Todas las muestras de control incluyeron los mismos componentes que la muestra de formulación experimental, excepto porque las muestras de control no incluyeron DMA. A continuación se exponen los resultados para el efecto de DMA sobre la conservación de la actividad de papaína unida a lo largo de un periodo de 12 semanas a diversas temperaturas. Además, en la figura 13(a) se ilustra la química de DMA, papaína unida y alginato de sodio.

10 Tal como puede deducirse a partir de los datos anteriores y las figuras 13(b), 13(c), 14 y 15, la reticulación de papaína unida con DMA al 1% mejoró significativamente la estabilidad del producto de papaína unida a lo largo de una variedad de temperaturas a lo largo de un periodo de 12 semanas en comparación con las muestras de control que no contenían nada de DMA.

15 Además, tal como se expuso anteriormente en la tabla 15, se determinó la actividad de papaína en la muestra experimental y el control basándose en el cambio de fluorescencia por muestra unitaria de la papaína unida. Se desarrolló una curva patrón de papaína de Sigma tal como se muestra en la figura 16 para ayudar en la cuantificación de la actividad de papaína al 1% inmovilizada que se reticuló adicionalmente con DMA al 1% según la presente realización. Tal como se indicó anteriormente, se usó un kit de ensayo de proteasa EnzChek® (E-6639) para obtener la curva patrón y el cambio de fluorescencia por muestra unitaria de las muestras experimentales de papaína inmovilizada con DMA según la presente realización a modo de ejemplo y las muestras de control sin DMA.

### Ejemplo 5

20 En otra realización a modo de ejemplo, se hizo reaccionar papaína inmovilizada con DMA al 5% para la reticulación adicional y con alginato de sodio al 0,1% y se incluyó como parte del sistema conservante que comprendía fenoxietanol al 1,2% + ácido benzoico al 0,2%. A continuación se exponen el protocolo y los resultados para esta realización. La formulación de placebo contiene todos los componentes de la formulación experimental, excepto por DMA.

25 Tabla 16

Muestras de formulación de 11 semanas		Factor de dilución	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio	promedio-unidades/ml negativo	unidades/ml
4°C								
963030/1		1:4	1245	1342	1290	1292,3	151	0,055
963030/3		1:4	1677	1549	1682	1636,0	495	0,244
25°C								
963030/1		1:4	1245	1232	1310	1262,3	121	0,039
963030/3		1:4	1581	1621	1590	1597,3	456	0,222
45°C								
963030/1		1:4	1245	1154	1167	1188,7	48	-0,002
963030/3		1:4	1576	1582	1501	1553,0	412	0,198
Muestras de formulación de 11 semanas		4°C	25°C	45°C				
963030/1		0,22	0,15	-0,01				
963030/3		0,97	0,89	0,79				
	número de fórmula		4°C	25°C	45°C			

ES 2 596 402 T3

muestras de 0 semanas	placebo	963030 /1	0,98	0,98	0,98
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	1,09	1,09	1,09
muestras de 2 semanas	placebo	963030 /1	4°C 0,85	25°C 0,82	45°C 0,41
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	1,12	1,21	1,05
muestras de 4 semanas	placebo	963030 /1	4°C 0,61	25°C 0,71	45°C 0,31
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	1,02	1,02	0,92
muestras de 8 semanas	placebo	963030 /1	4°C 0,44	25°C 0,31	45°C 0,15
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	1,00	0,95	0,85
muestras de 11 semanas	placebo	963030 /1	4°C 0,22	25°C 0,15	45°C -0,01
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	0,97	0,89	0,79
% de actividad de la semana 0					
muestras de 2 semanas	placebo	963030 /1	4°C 86,73	25°C 83,67	45°C 41,84
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	102,75	111,01	96,33
muestras de 4 semanas	placebo	963030 /1	4°C 62,24	25°C 72,45	45°C 31,63
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	93,58	93,58	84,40
muestras de 8 semanas	placebo	963030 /1	4°C 44,90	25°C 31,63	45°C 15,31
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	91,74	87,16	77,98
			4°C	25°C	45°C

muestras de 11 semanas	placebo	963030 /1	22,47	15,75	-0,74
	muestra de DMA al 5%	963030 /3	89,38	81,60	72,67

Tal como puede deducirse a partir de la tabla de datos anterior y las figuras 17-19, la reticulación de papaína inmovilizada con DMA al 5% mejoró significativamente la estabilidad del producto de papaína inmovilizada a lo largo de una variedad de temperaturas a lo largo de un periodo de 12 semanas en comparación con las muestras de control que no contenían nada de DMA.

- 5 Además, tal como se expone en las tablas de datos anteriores, se determinó la actividad de papaína en la muestra experimental y el control basándose en el cambio de fluorescencia por muestra unitaria de la papaína inmovilizada. Se desarrolló una curva patrón para papaína de Sigma en formulación de placebo tal como se muestra en la figura 20 para ayudar en la cuantificación de la actividad de papaína al 1% inmovilizada reticulada con DMA al 5% según la presente realización. Tal como se indicó anteriormente, se usó un kit de ensayo de proteasa EnzChek® (E-6639) para obtener la curva patrón y el cambio de fluorescencia por muestra unitaria de la muestra experimental de papaína unida con DMA según la presente realización a modo de ejemplo y la muestra de control sin DMA.

### Ejemplos 6 - 8

- 15 A continuación se representan ejemplos de formulaciones que pueden prepararse usando una o más proteasas estabilizadas. En la técnica se conoce una amplia variedad de formulaciones similares en las que pueden incorporarse fácilmente una o más proteasas estabilizadas a diversas concentraciones.

#### Ejemplo 6

Un gel de crema elástico a modo de ejemplo tiene, por ejemplo, la composición mostrada en la siguiente tabla:

FASE	%	PROVEEDOR	MATERIA PRIMA	NOMENCLATURA INCI
A	63,300	Local	Agua desionizada	Agua
A	0,050	Local	EDTA de disodio	Disodio EDTA
A	1,100	Clariant	Aristoflex AVC/USA	Copolímero de acriloidimetiltaurato de amonio / VP
A	0,150	Clariant	Aristoflex HMB	Polímero reticulado de acriloidimetiltaurato de amonio / metacrilato de beheneth-25
A	3,000	Local	Butilenglicol	Butilenglicol
A	2,000	Local	Glicerina	Glicerina
B	15,000	Momentive	Velvesil DM	Polímero reticulado de dimeticona y cetearil-dimeticona
B	3,000	Dow Corning	Dow Corning 1413	Dimeticona
C	1,200	Seppic	Simulgel NS	Copolímero de acrilato dehidroxietilo / acriloidimetiltaurato de sodio y escualano y polisorbato 60
D	3,000	BASF	Papaína estabilizada de la presente invención	
D	1,000	BASF	Germazide PSB	Fenoxietanol, clorfenesina, ácido benzoico, butilenglicol, ácido sórbico
E	2,000	Alzo	CUPL PIC	Acetato de isoceteth-20 de PPG-2
E	2,000	Firmenich, Inc.	Hedione	Dihidrojasmonato de metilo
F	0,100	BASF	Cloisonne Red 424C	Mica y dióxido de titanio y carmín
F	0,100	BASF	Timica Silver Sparkle 5500	Mica y dióxido de titanio
F	3,000	Local	Agua	Agua

- 20 En un recipiente principal, combinar fase A. Mezclar de manera homogénea y mezclar con barrido hasta que se hidrata el polvo y el lote es uniforme. Cuando la fase A es uniforme, añadir la fase B al recipiente principal mientras se mezcla de manera homogénea. Mezclar hasta que es uniforme. Añadir la fase C al recipiente principal mientras se mezcla de manera homogénea. Mezclar hasta que es uniforme. Añadir la fase D al recipiente principal mientras se mezcla de manera homogénea. Mezclar hasta que es uniforme. Calentar los componentes de la fase E hasta de

- 150 a 40°C hasta que se funden. Realizar un mezclado previo de la fase E y añadirla al recipiente principal mientras se mezcla de manera homogénea. Realizar un mezclado previo de la fase F. Mezclar hasta que todas las perlas están en suspensión y no hay grumos. Seguir mezclando durante la adición. Añadir la fase F al recipiente principal mientras se mezcla de manera homogénea. Apagar la mezcladora-homogeneizadora tras la adición y mezclar con barrido hasta que es uniforme.
- 5

### Ejemplo 7

Una loción a modo de ejemplo tiene, por ejemplo, la composición mostrada en la siguiente tabla

FASE	%	PROVEEDOR	MATERIA PRIMA	NOMENCLATURA INCI
A	85,50	Local	Agua desionizada	Agua
A	0,050	Local	EDTA de disodio	EDTA de disodio
A	3,0	Local	1,3-Butilenglicol	Butilenglicol
A	1,0	Clariant	Aristoflex AVC/USA	Copolímero de acriloldimetiltaurato de amonio / VP
B	8,0	Inolex	Lexol GT 865	Triglicérido caprílico / cáprico
B	0,25	Arlacel 165V	Croda	Estearato de glicerilo y estearato de PEG-100
C	3,0		Papaína estabilizada de la presente invención	
D	1,2	BASF	Germazide PSB	Fenoxietanol y clorfenesina y ácido benzoico y butilenglicol y ácido sórbico
F	3,000	Local	Agua	Agua

- 10 Mezclar la fase A hasta que es homogénea mientras se calienta hasta 65-70°C. En un recipiente distinto, realizar el mezclado previo de la fase B. Calentar hasta 70-75°C o hasta que es homogénea. Cuando ambas fases A y B están a la temperatura deseada, añadir la fase B a la fase A y mezclar de manera homogénea hasta que es uniforme. Cuando la fase AB es uniforme, comenzar a enfriar y añadir la fase C a 35-30°C y mezclar con una mezcladora de hélice hasta que es uniforme. Añadir la fase D previamente mezclada a la fase ABC con mezcladora homogeneizadora. Mezclar hasta que es uniforme.

### Ejemplo 8

- 15 En esta realización, la estabilidad de papaína unida a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas en una formulación de O/W. Los resultados se obtuvieron mediante un ensayo de la actividad de papaína usando un kit de ensayo EnzChek de Invitrogen tras suspender la formulación en Triton X-100 al 0,1%, n=3.

- 20 Tal como se muestra en la figura 21, el producto de papaína unida se estabiliza adicionalmente mediante una formulación de aceite en agua. Se conserva aproximadamente el 75% de actividad tras 12 semanas a 45°C. Se encontró que la formulación era estable a todas las temperaturas sometidas a prueba. Estos resultados indican que cuando se incluyen productos de papaína reticulada en una formulación de aceite y agua este producto se estabiliza incluso más.

**REIVINDICACIONES**

1. Producto de proteasa estabilizada que comprende una proteasa reticulada a un carbómero, en el que las aminas primarias de la proteasa están reticuladas a grupos carboxilo del carbómero y en el que las aminas de dicha proteasa están reticuladas adicionalmente a través de un agente de reticulación reactivo con amina.
- 5 2. Proteasa estabilizada según la reivindicación 1, en la que la proteasa estabilizada comprende además un estabilizador físico, en la que el estabilizador físico es preferiblemente un azúcar o polímero de azúcar.
3. Proteasa estabilizada según la reivindicación 2, en la que la proteasa estabilizada comprende entre el 0,1% y el 5% del estabilizador físico y en la que el estabilizador físico es un azúcar o polímero de azúcar.
- 10 4. Proteasa estabilizada según la reivindicación 2, en la que el azúcar o polímero de azúcar se selecciona del grupo que consiste en alginato de sodio, trehalosa, manitol, glicerol, goma xantana, sacarosa y sorbitol, preferiblemente alginato de sodio.
5. Proteasa estabilizada según la reivindicación 1, en la que la proteasa se selecciona del grupo que consiste en papaína, ficina, bromelaína y actinidina.
6. Proteasa estabilizada según la reivindicación 5, en la que la proteasa es papaína.
- 15 7. Proteasa estabilizada según la reivindicación 5, que comprende entre el 0,1% y el 5% de la proteasa.
8. Proteasa estabilizada según la reivindicación 1, en la que el agente de reticulación reactivo con amina se selecciona del grupo que consiste en adipimidato de dimetilo (DMA), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), suberimidato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP) y suberato de disuccinimidilo (DSS).
- 20 9. Proteasa estabilizada según la reivindicación 1, en la que la proteasa es papaína y el agente de reticulación reactivo con amina es DMA.
10. Producto de proteasa estabilizada según la reivindicación 1, que comprende además un sistema conservante.
11. Producto de proteasa estabilizada según la reivindicación 10, en el que el sistema conservante comprende fenoxietanol y ácido benzoico.
- 25 12. Producto de proteasa estabilizada según la reivindicación 10, en el que el sistema conservante comprende diocida.
13. Método de formación de una proteasa estabilizada que comprende:  
realizar una reacción de reticulación primaria para reticular aminas primarias de la proteasa a los grupos carboxilo de un carbómero; y  
realizar una reacción de reticulación secundaria en la proteasa a través de un agente de reticulación reactivo con amina.
- 30 14. Método según la reivindicación 13, en el que la reacción de reticulación primaria se lleva a cabo usando los agentes de reticulación carbodiimida, clorhidrato de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y N-hidroxisulfosuccinimida.
- 35 15. Método según la reivindicación 13, en el que el reactivo de reticulación para realizar la reacción de reticulación secundaria es uno seleccionado del grupo que consiste en adipimidato de dimetilo (DMA), suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3), suberimidato de dimetilo (DMS), pimelimidato de dimetilo (DMP) y suberato de disuccinimidilo (DSS), y es preferiblemente DMA.
16. Método según la reivindicación 13, en el que la reacción de reticulación secundaria se realiza mediante del 1% al 5% en peso del agente de reticulación reactivo con amina.
- 40 17. Método según la reivindicación 13, que comprende además añadir un estabilizador físico tras realizar la reacción de reticulación secundaria, en el que el estabilizador físico es preferiblemente alginato de sodio.
18. Método para el tratamiento cosmético de piel seca, envejecida o dañada que comprende la aplicación a la piel de una composición que comprende una o más proteasas estabilizadas según la reivindicación 1.

19. Composición que comprende una o más proteasas estabilizadas según la reivindicación 1 para su uso en desbridamiento de heridas o quemaduras mediante aplicación tópica.

20. Uso de una composición que comprende una o más proteasas estabilizadas según la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para su uso en un método de desbridamiento de heridas o quemaduras, en el que la composición se administra por vía tópica.

5

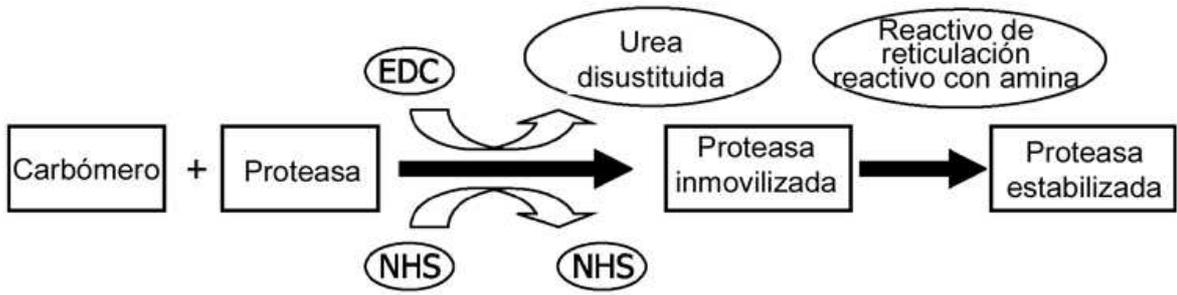
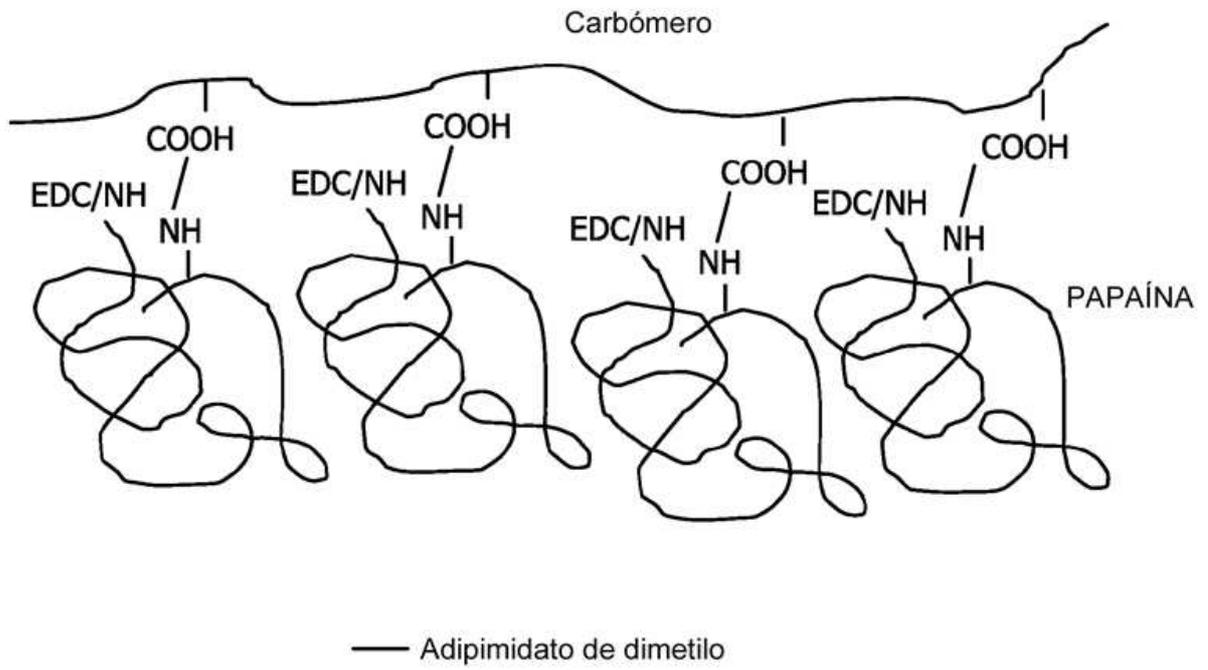


FIG. 1



**FIG. 2**

% de actividad del día 0 tras almacenar las muestras de DMA al 1% a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas

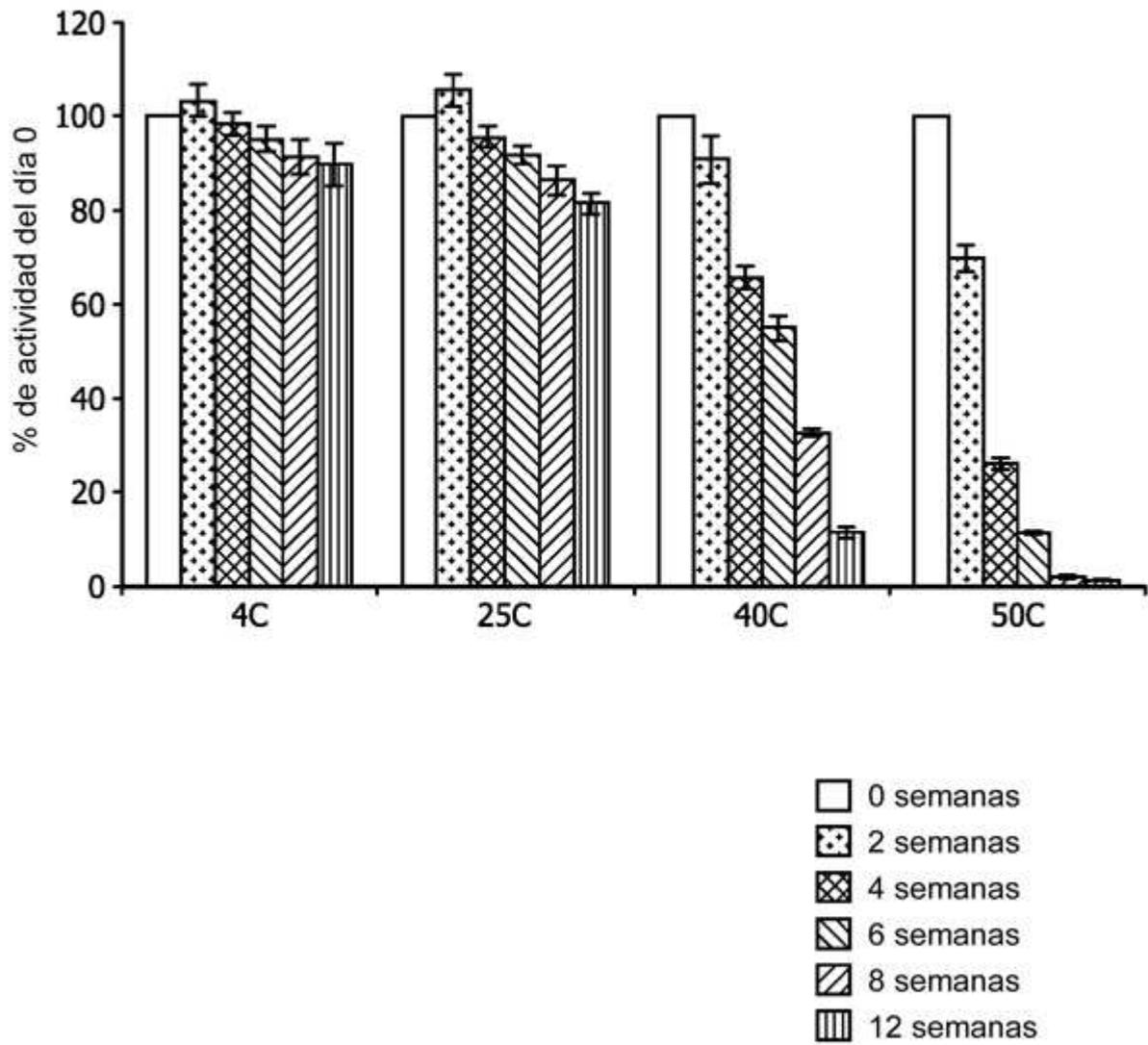


FIG. 3

% de actividad del día 0 tras almacenar las muestras sin DMA a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas

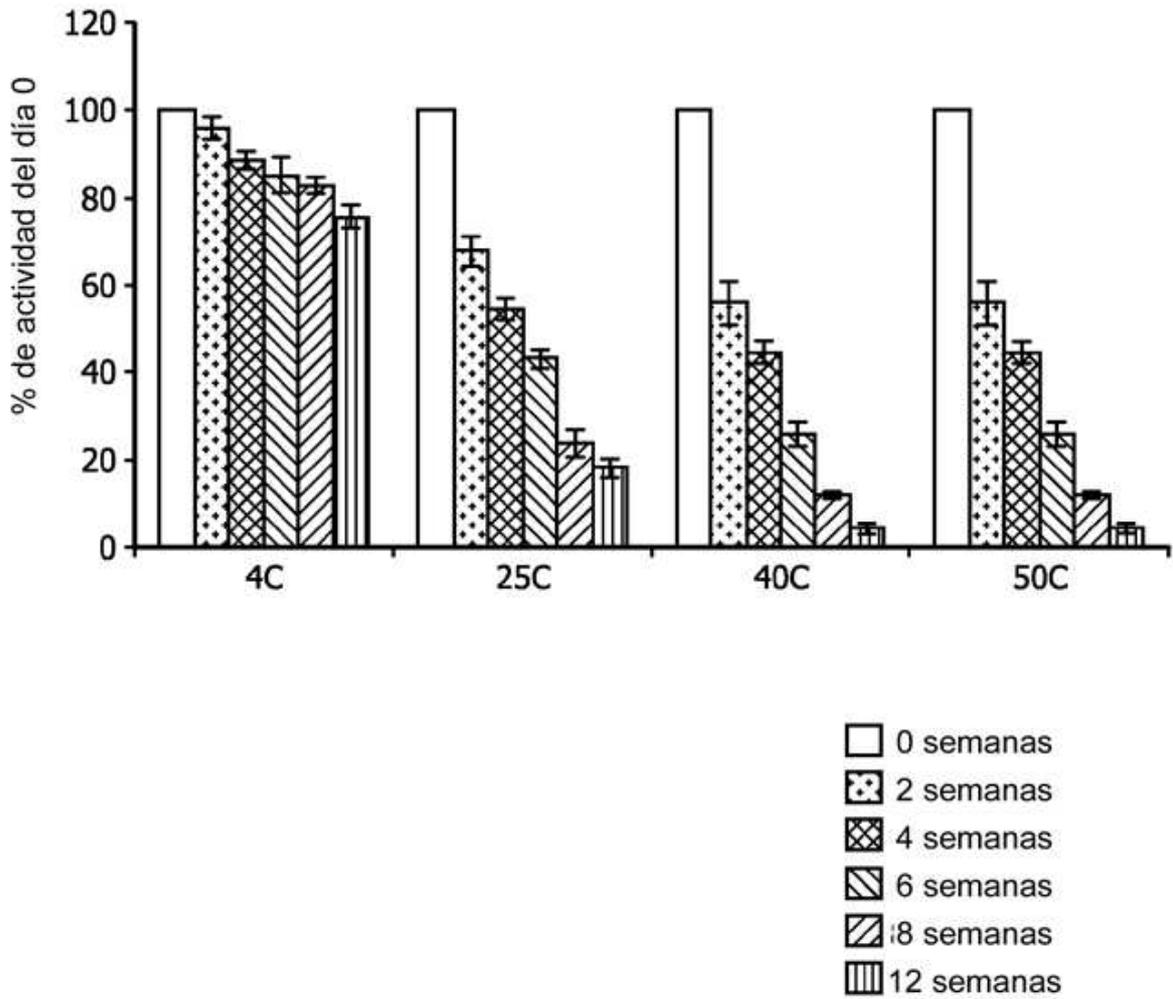


FIG. 4

Curva patrón de papaína de Sigma

$$y = 6410.5x + 515.15$$
$$R^2 = 0.9499$$

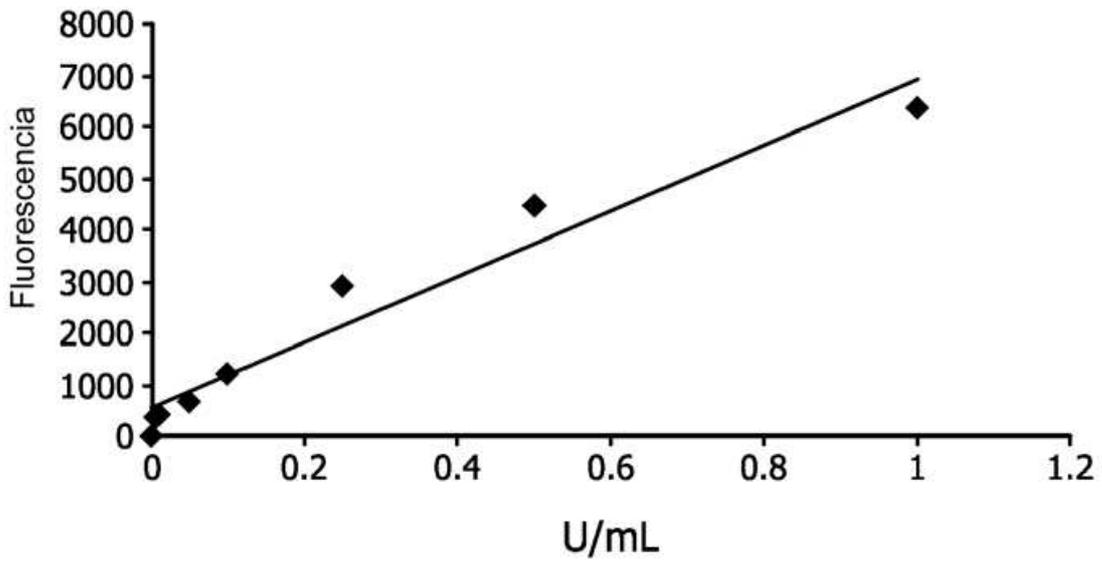


FIG. 5

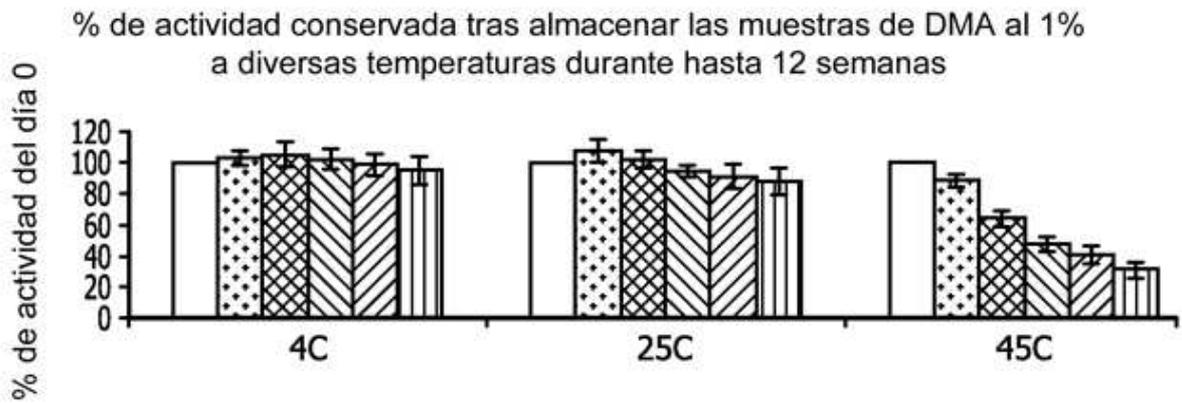


FIG. 6(a)

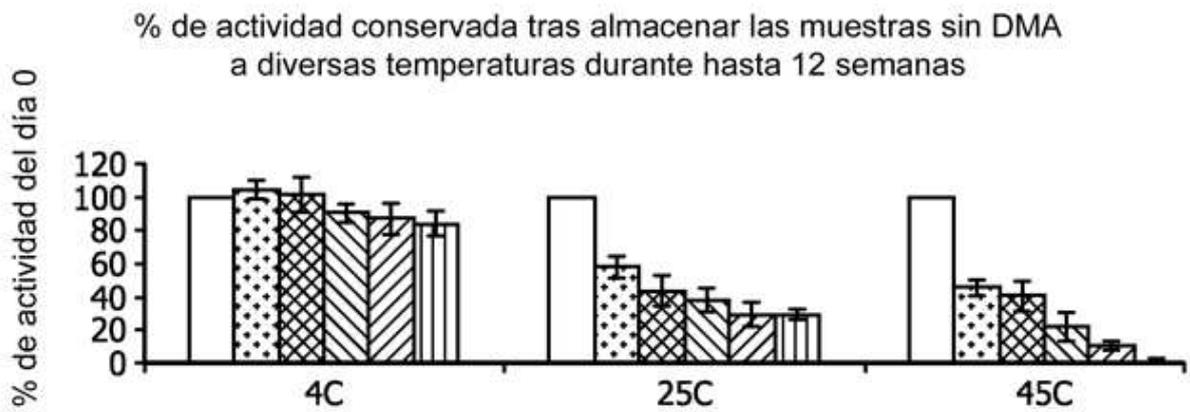


FIG. 6(b)

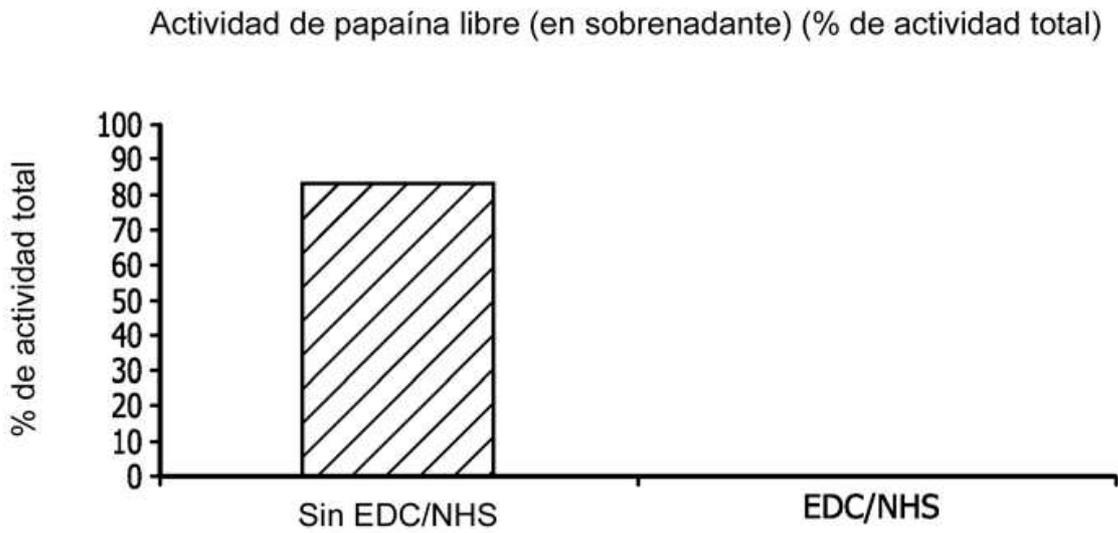
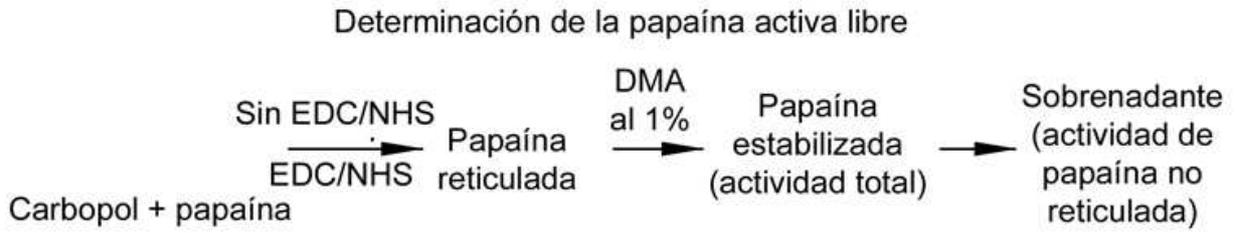


FIG. 7

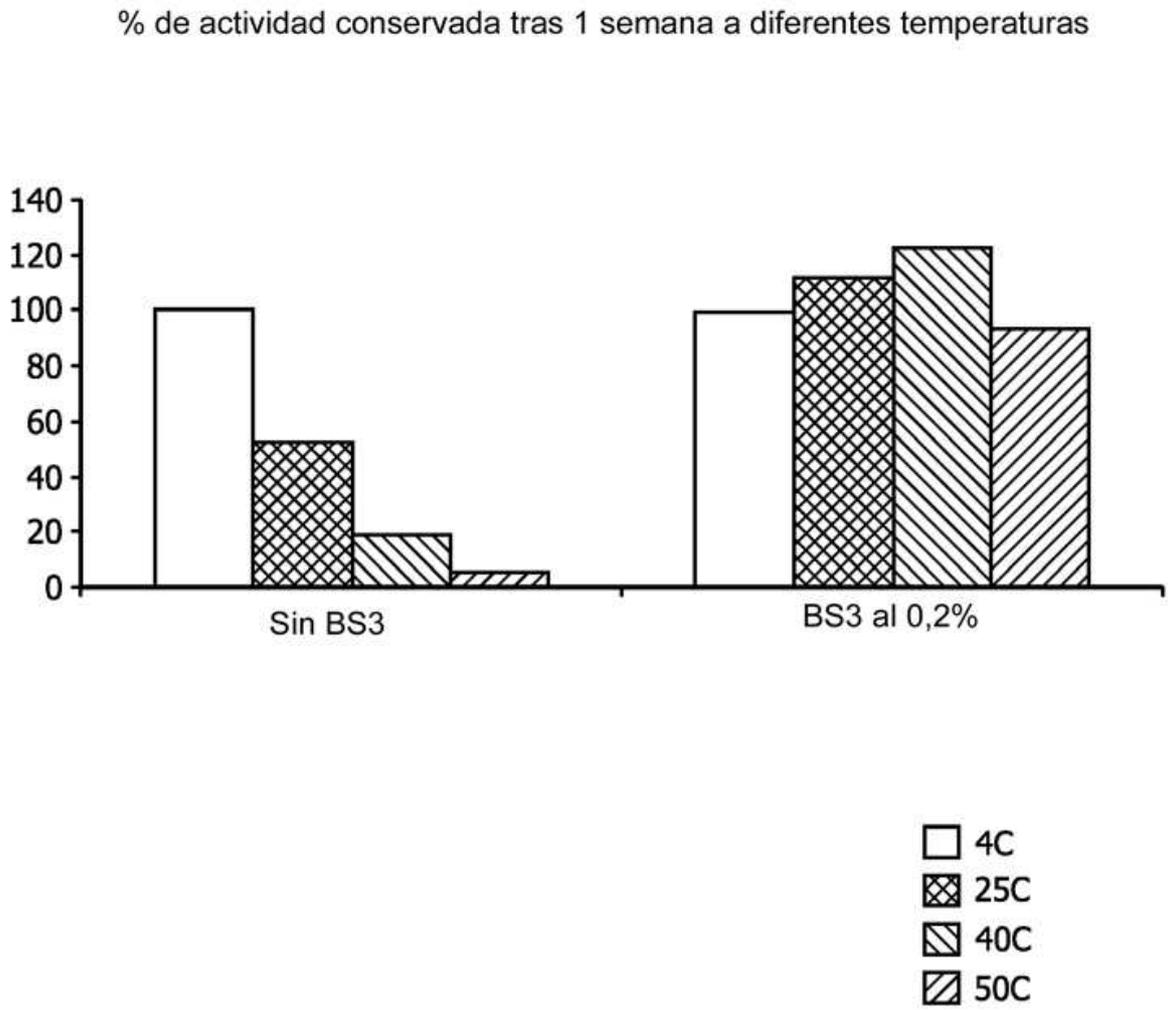


FIG. 8

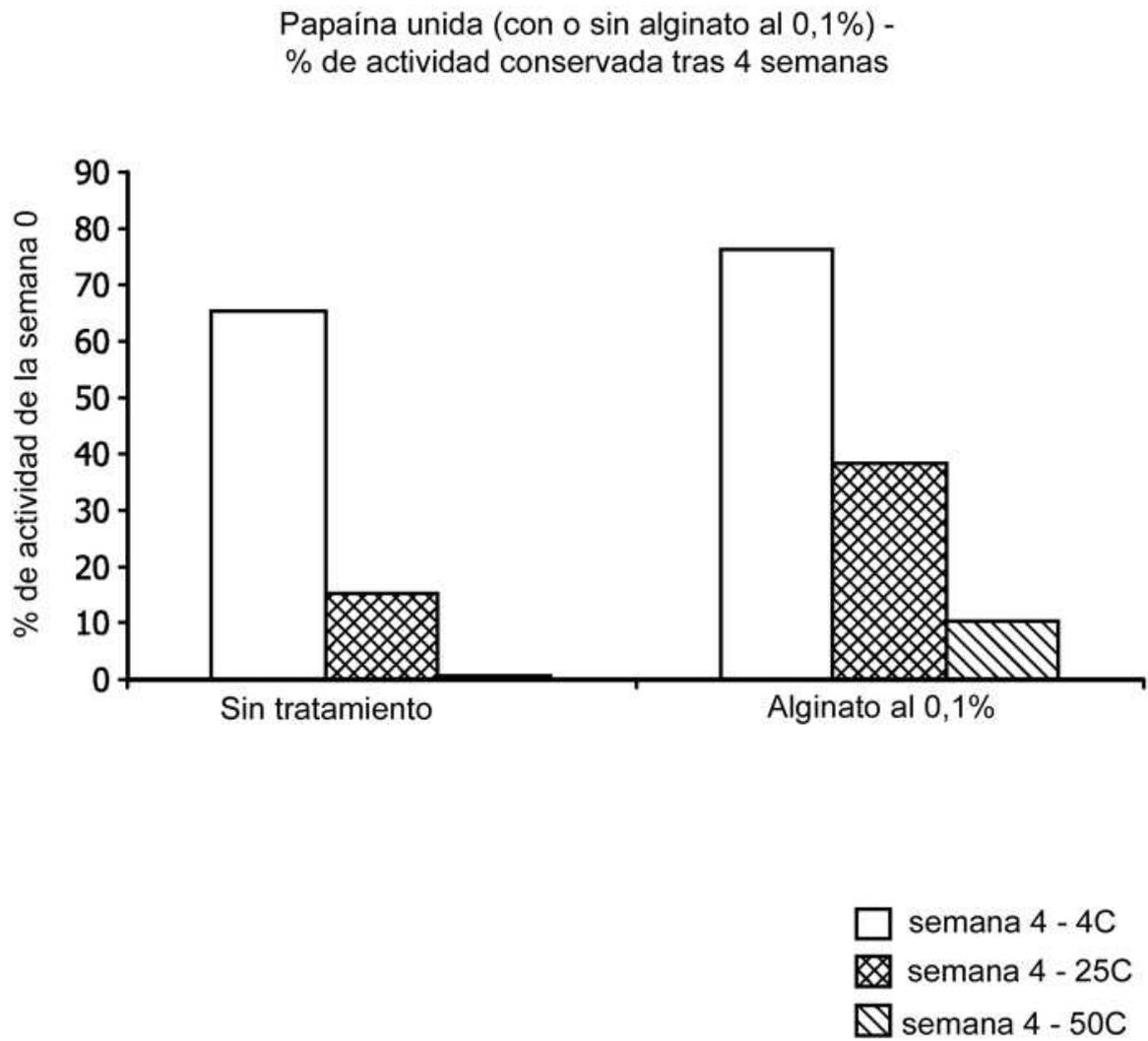


FIG. 9

Curva patrón de papaína de Sigma

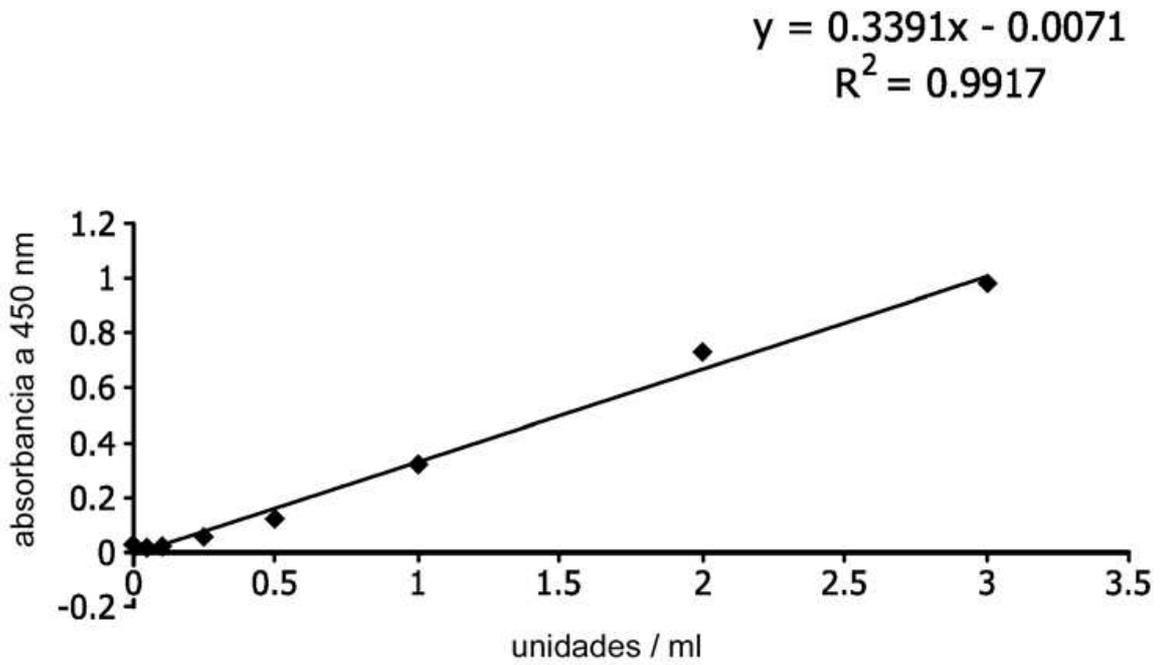


FIG. 10

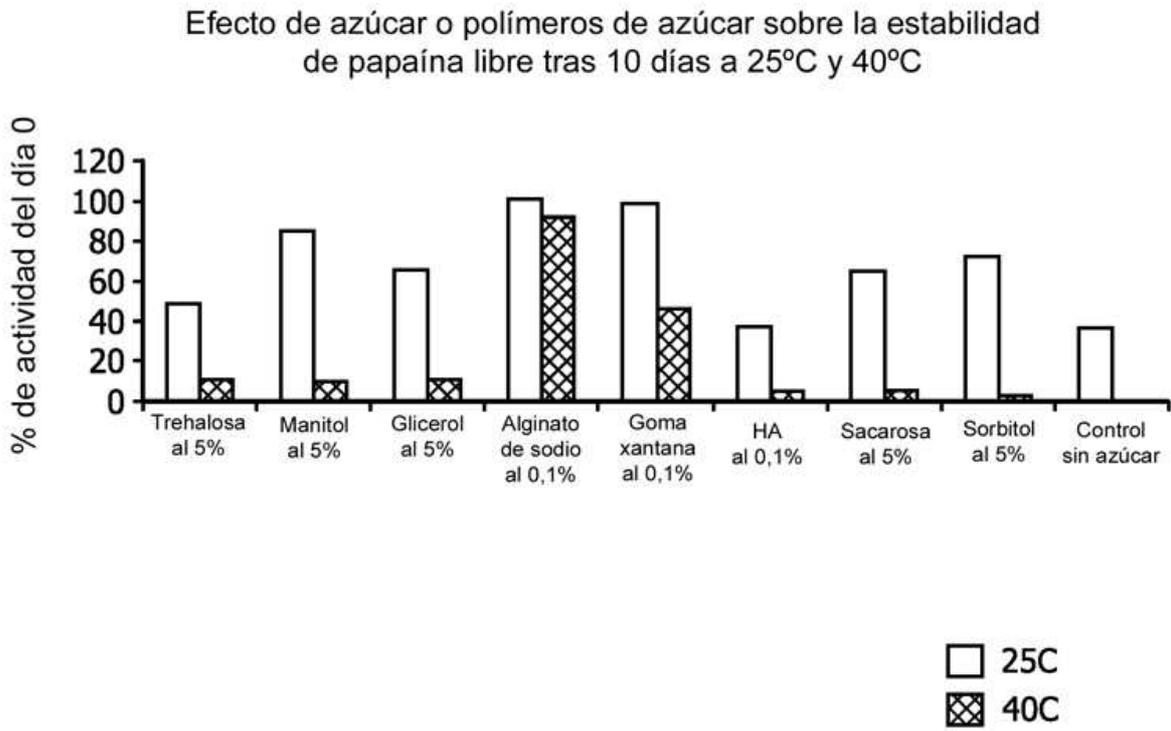


FIG. 11

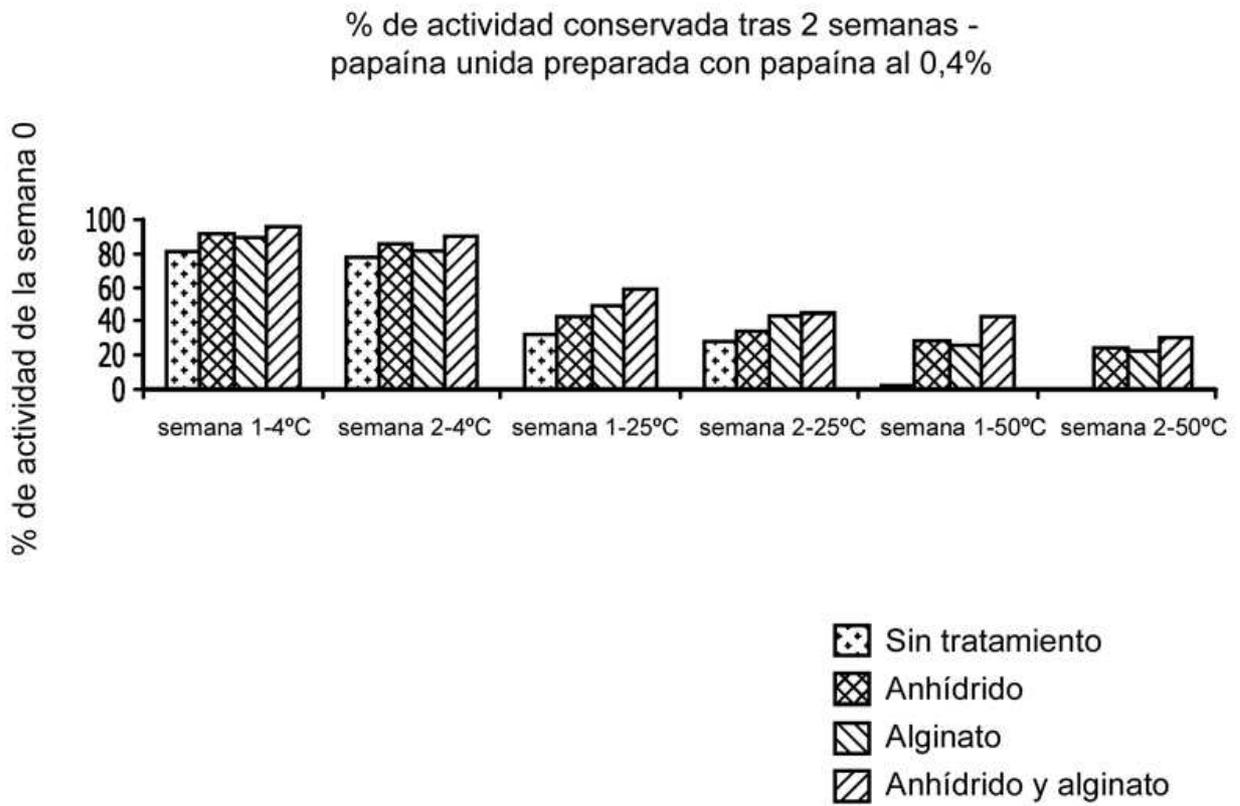


FIG. 12

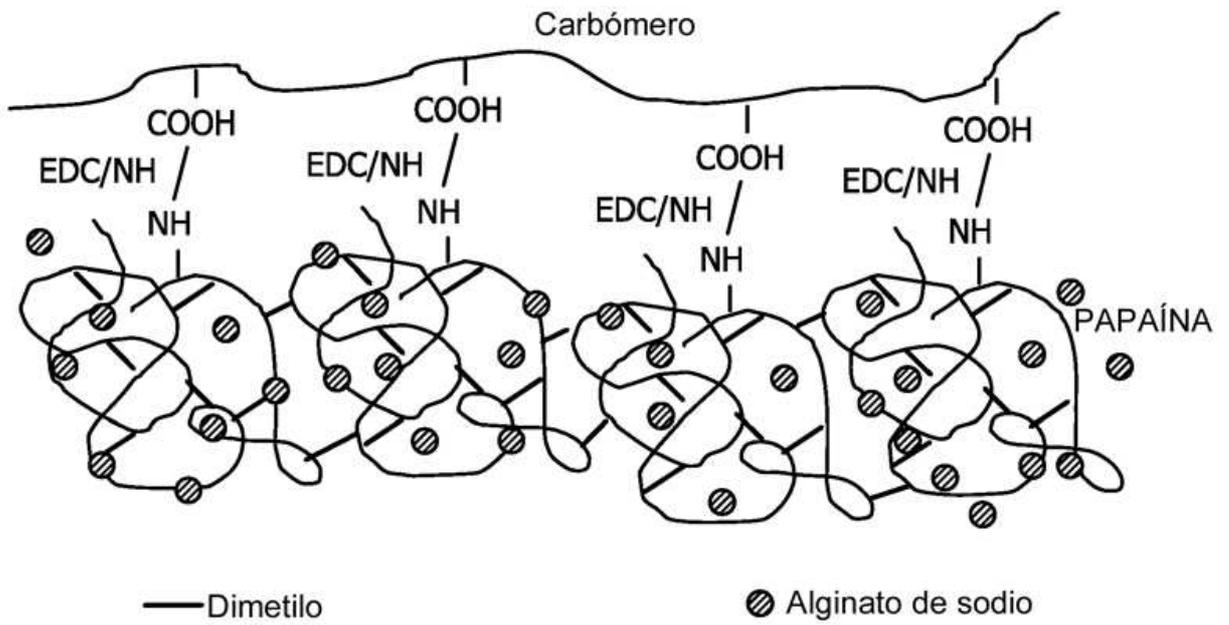


FIG. 13(a)

% de actividad conservada tras almacenar las muestras de DMA al 1% a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas

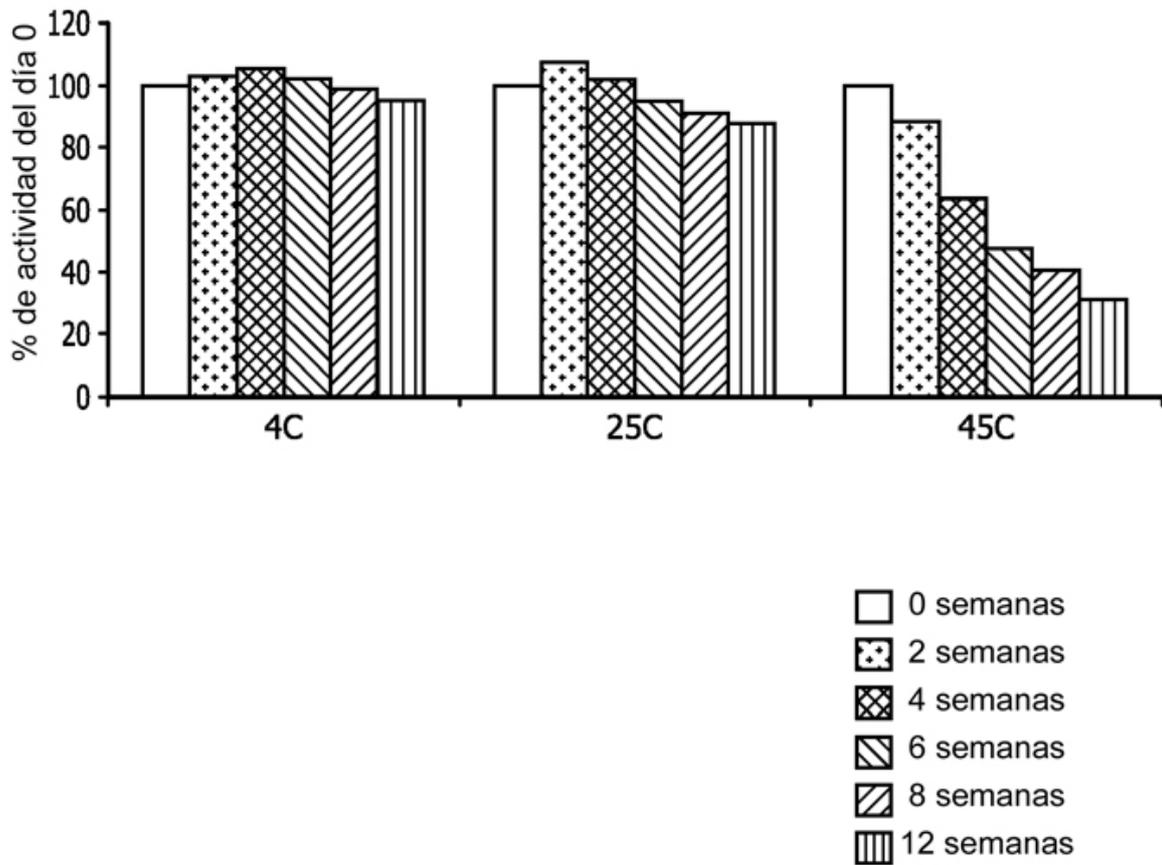


FIG. 13(b)

% de actividad del día 0 conservada tras almacenar la muestra sin DMA a diversas temperaturas durante hasta 12 semanas

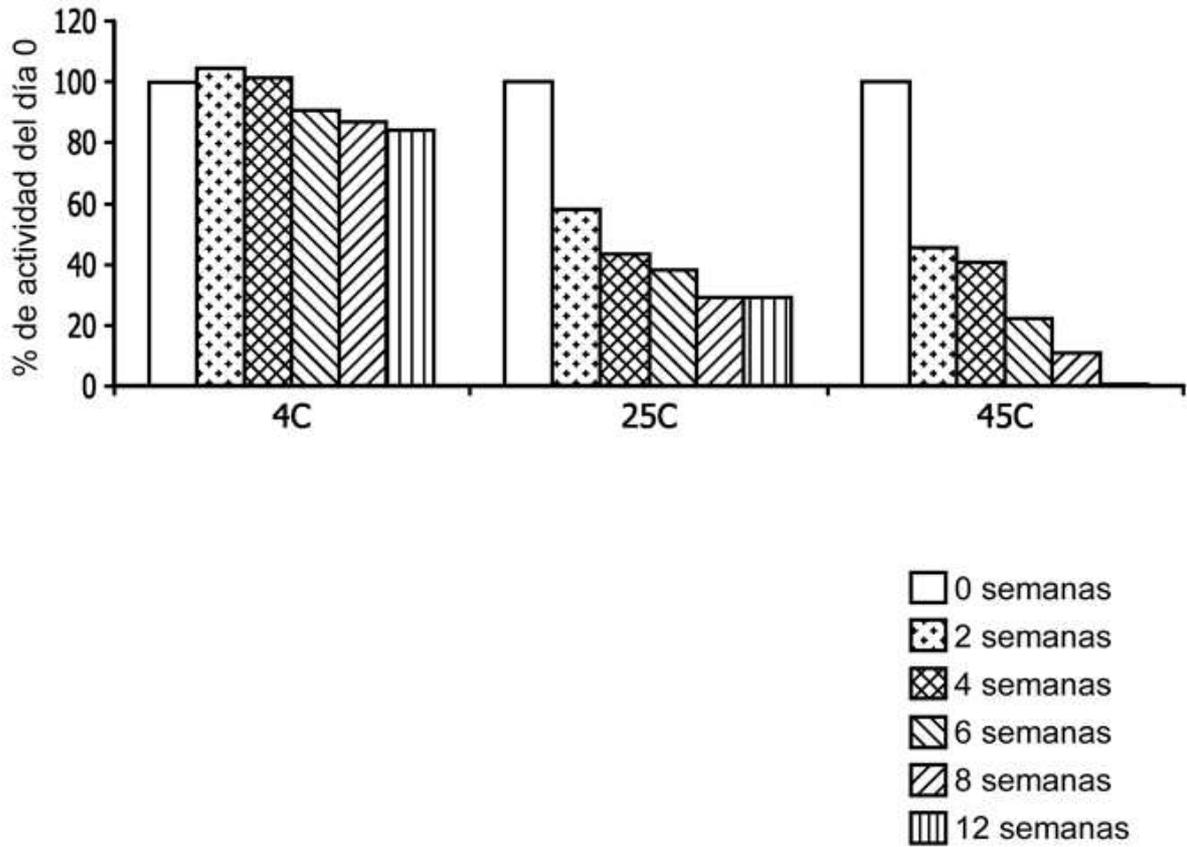


FIG. 13(c)

Efecto de DMA sobre la conservación de la actividad de papaina unida

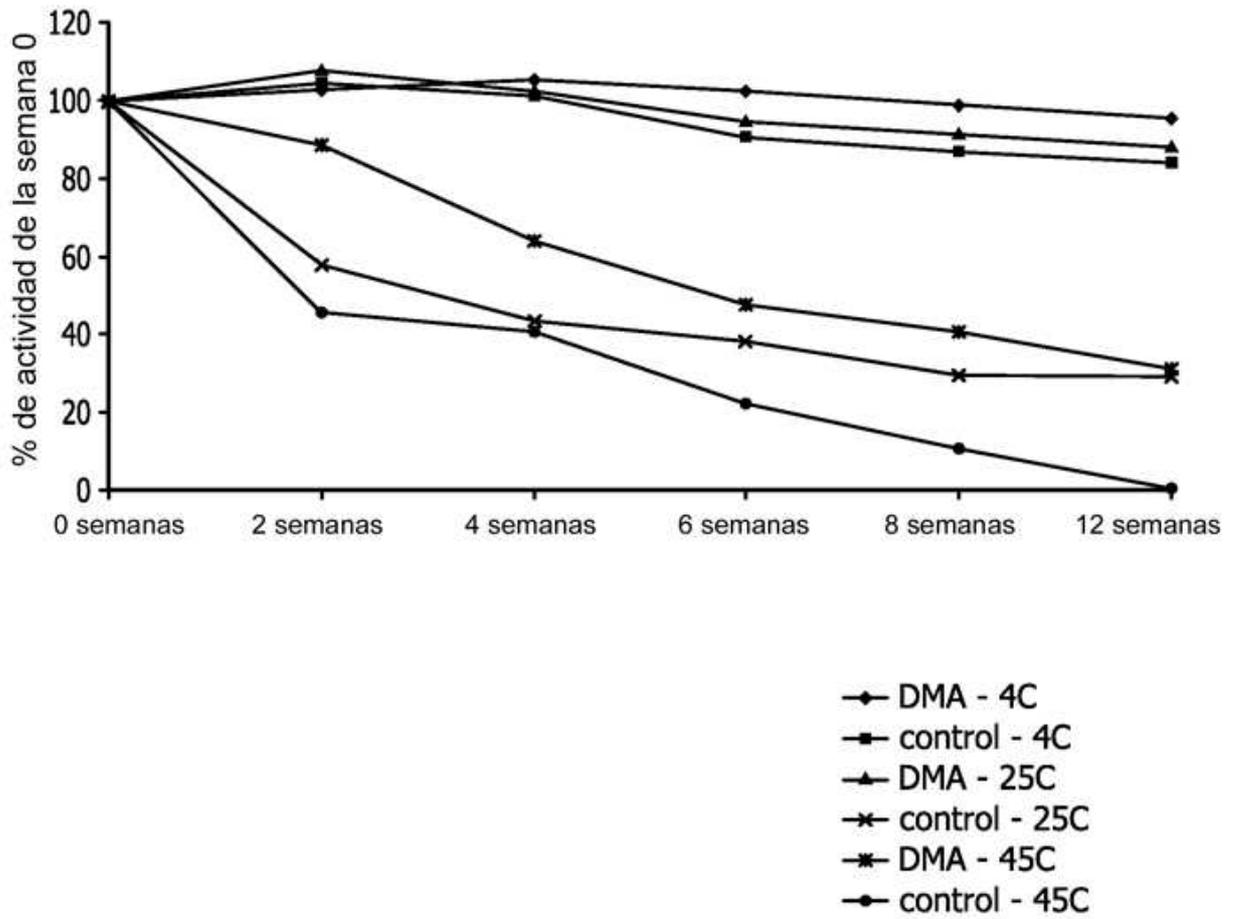


FIG. 14

Actividad de muestras de papaína unida tras 12 semanas a diferentes temperaturas

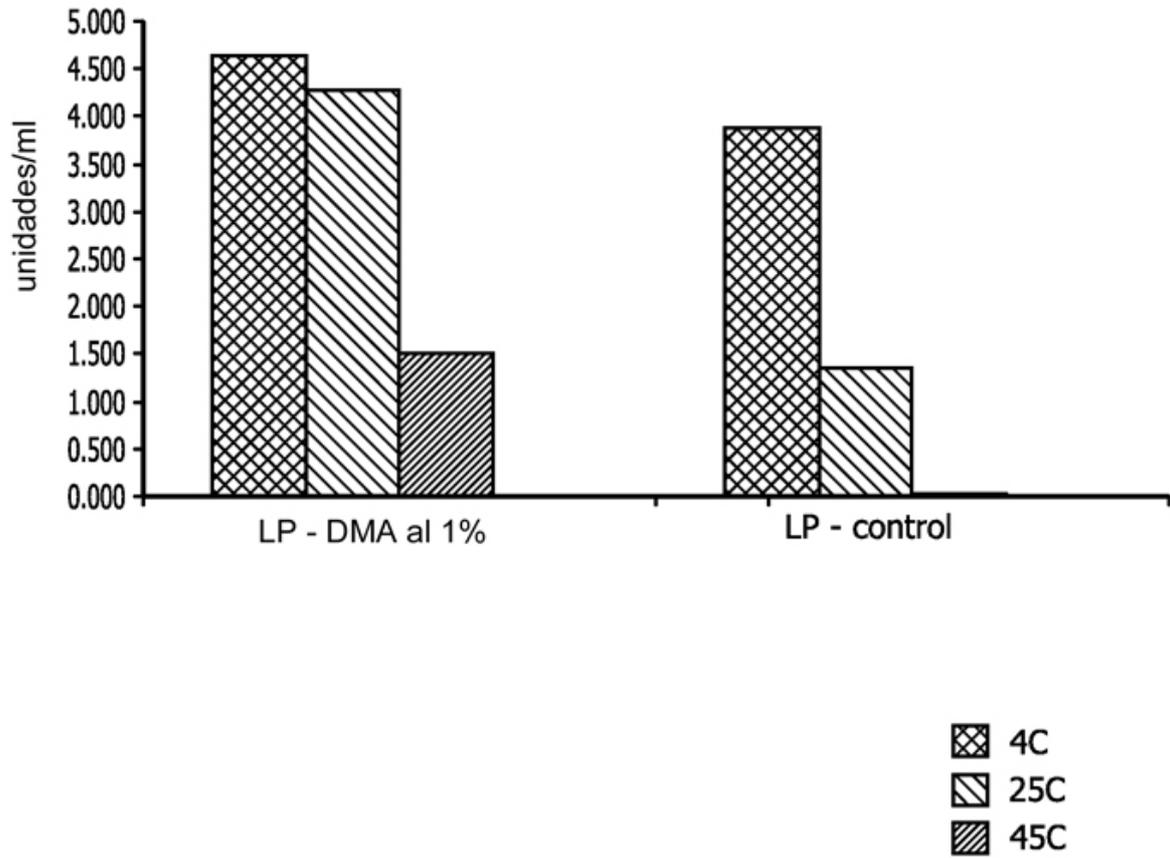


FIG. 15

Curva patrón de papaína de Sigma

$$y = 6310.1x + 564.49$$
$$R^2 = 0.9469$$

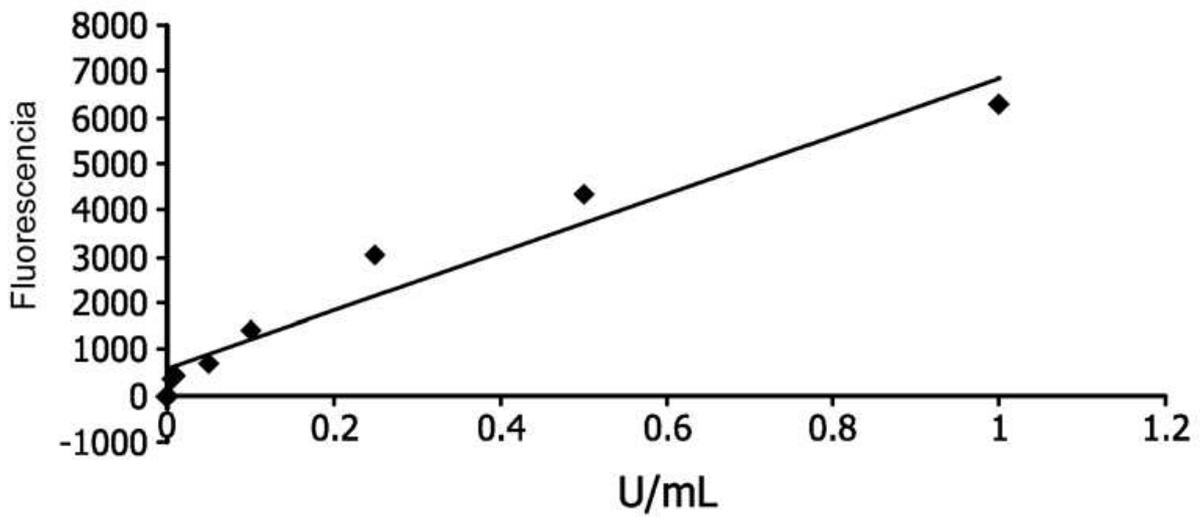


FIG. 16

Actividad de papaína unida (con DMA) conservada en la formulación

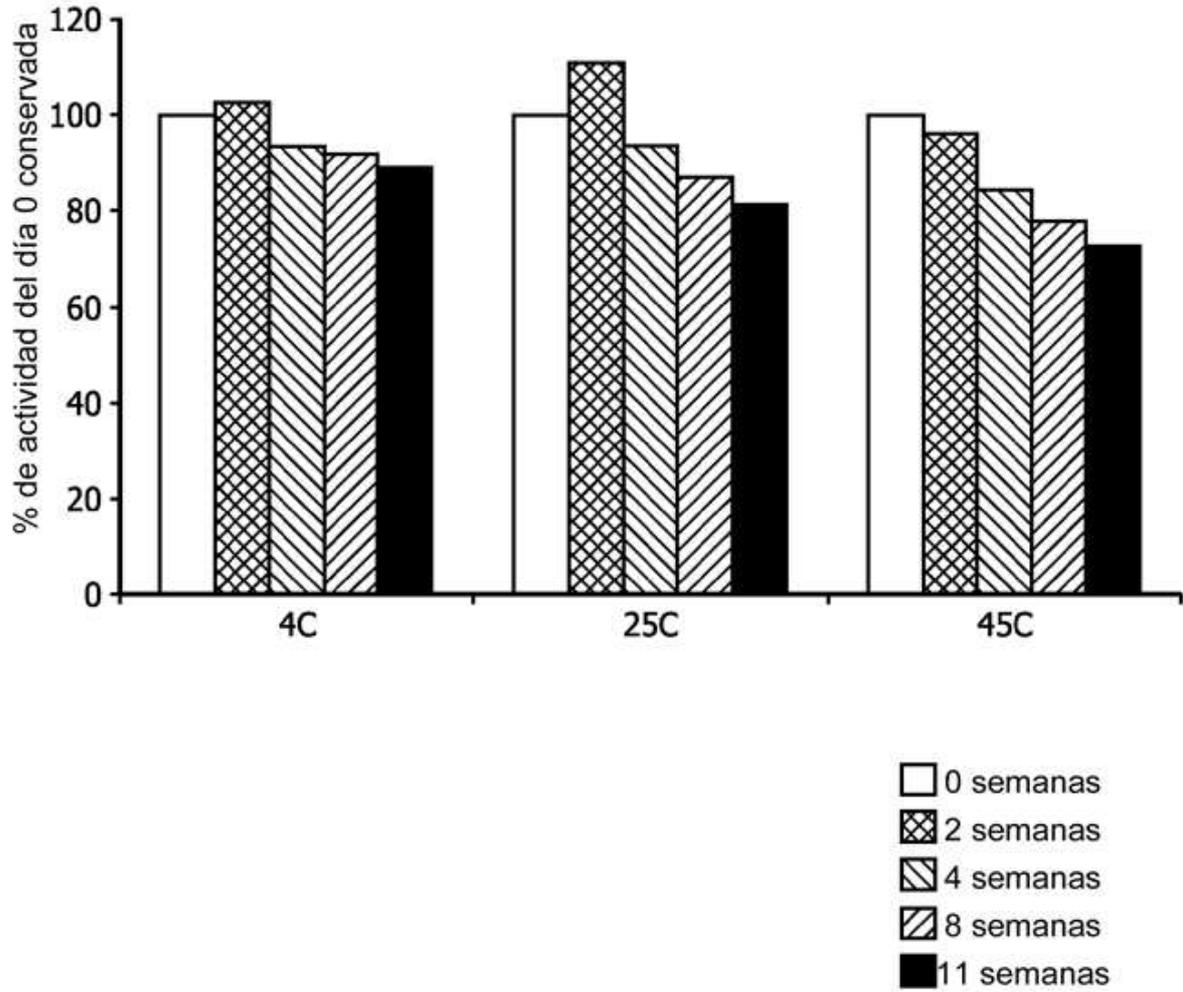


FIG. 17

Actividad de papaína unida (sin DMA) conservada en la formulación

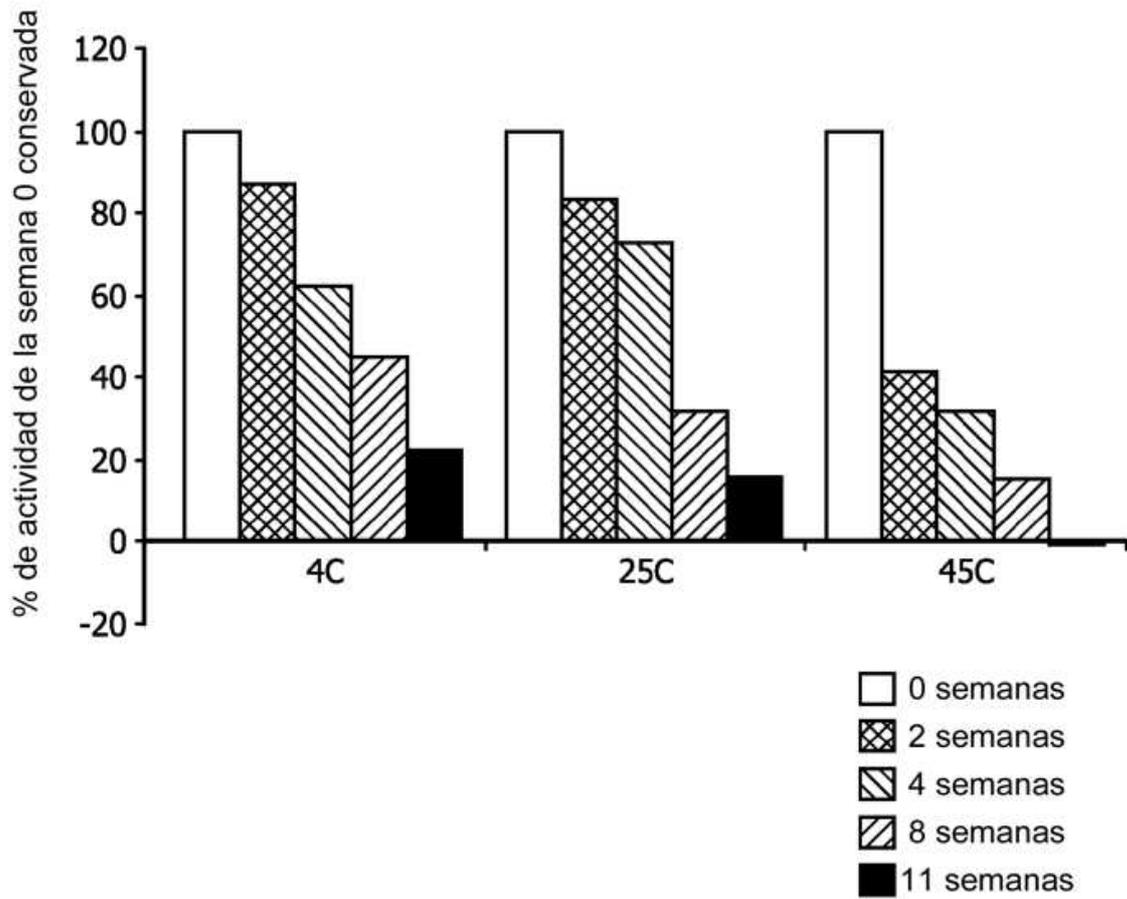


FIG. 18

Actividad de papaína unida conservada dentro de formulaciones

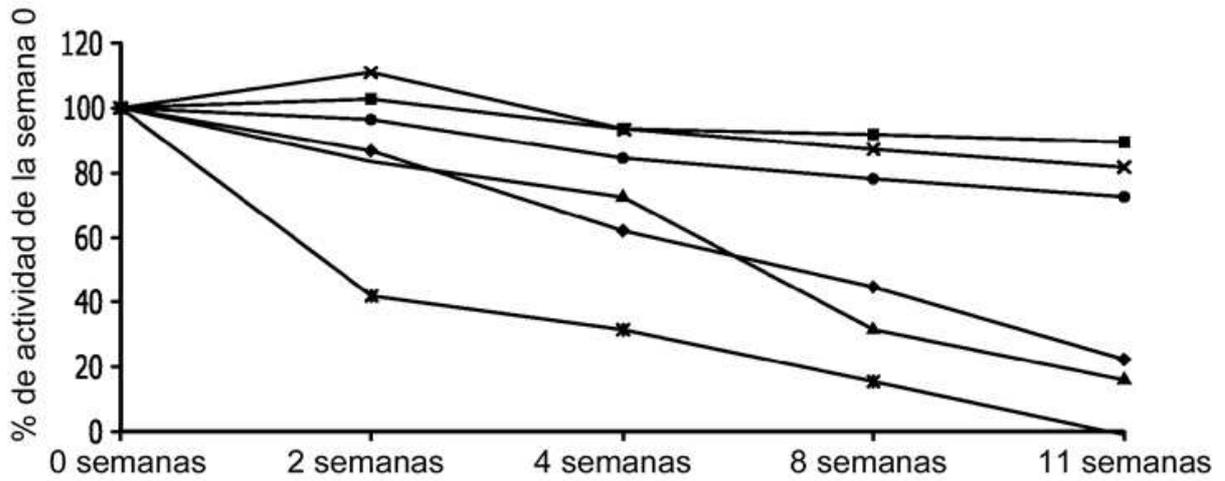


FIG. 19

Curva patrón para papaína de Sigma en formulación de placebo

$$y = 1823.1x + 50.983$$
$$R^2 = 0.9968$$

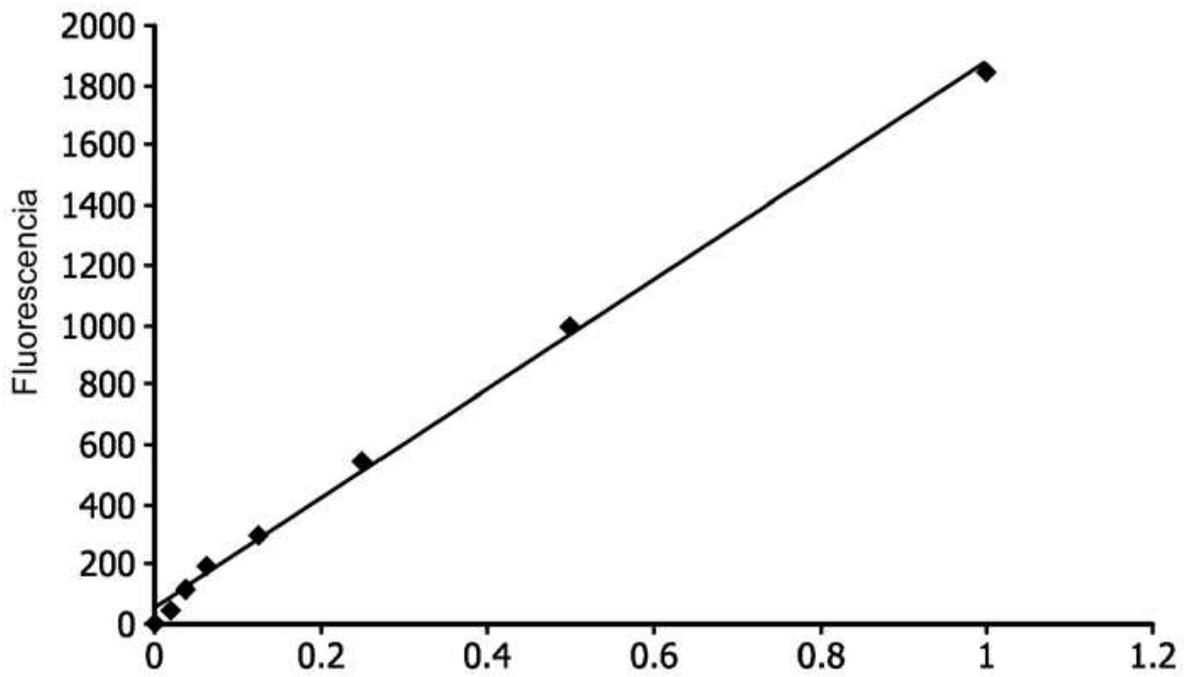


FIG. 20

Actividad de papaína unida conservada en formulación de aceite en agua

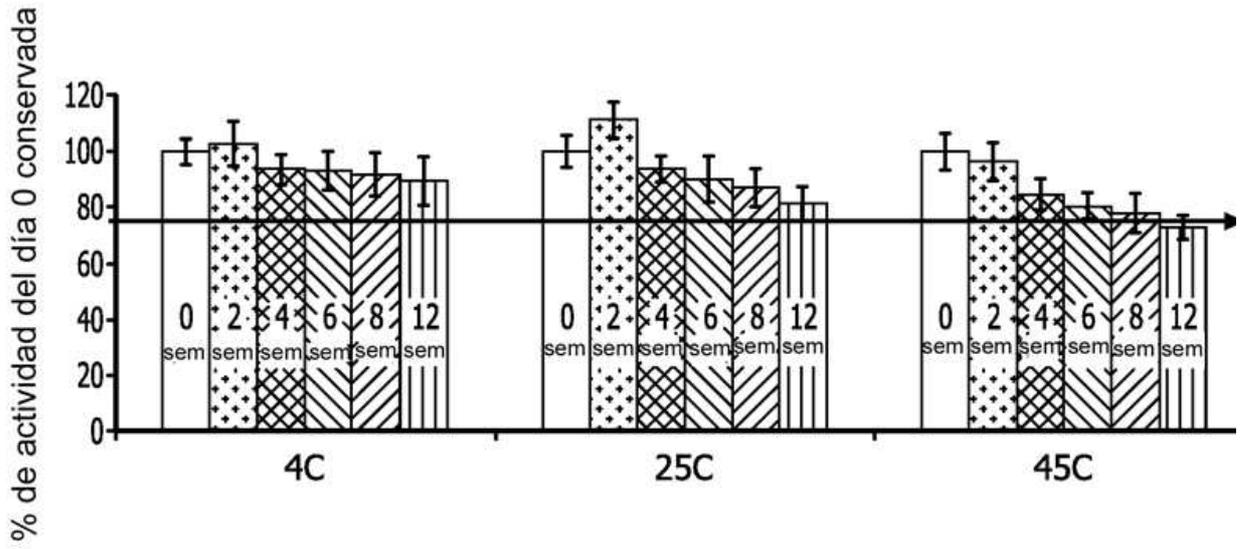


FIG. 21