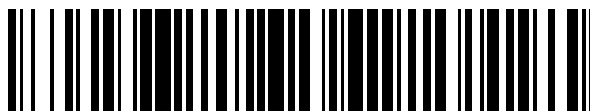


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 568**

51 Int. Cl.:

A61P 19/04 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2012 PCT/IL2012/050261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2012 E 12815526 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2734216**

54 Título: **Extracto proteolítico de bromelaína para el tratamiento de trastornos del tejido conectivo**

30 Prioridad:

20.07.2011 US 201161509612 P

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

21.11.2018

73 Titular/es:

**MEDIWOUND, LTD. (100.0%)
42 Hayarkon Street, Northern Industrial Zone
Yavne 81227, IL**

72 Inventor/es:

**ROSENBERG, LIOR;
RUBIN, GUY y
ASCULAI, EILON**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 690 568 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

Extracto proteolítico de bromelaína para el tratamiento de trastornos del tejido conectivo

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un extracto proteolítico para uso en el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo. En particular, la composición farmacéutica puede usarse para el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.

10

Antecedentes de la invención

El colágeno es el componente principal del tejido conectivo y se encuentra principalmente en tejidos fibrosos tales como el tendón, los ligamentos y la piel. Numerosas enfermedades y afecciones están asociadas con el exceso de deposición de colágeno, las más comunes son la enfermedad de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.

15

La enfermedad de Dupuytren (DD) es un trastorno del tejido conectivo de producción anormal de colágeno y deposición en la mano que se caracteriza comúnmente por contractura de las articulaciones metacarpofalángicas (MCPJ) y articulaciones interfalángicas proximales (PIPJ) en los dedos anular y meñique. La proliferación y diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos con deposición excesiva de colágeno a nivel de la fascia palmar causa formación de nódulos y cordones fibróticos en la palma y/o los dedos. Los cordones o nódulos fibróticos pueden ser de diferentes grosores, desde 1 milímetro de diámetro para los cordones fibróticos hasta casi 10 milímetros de diámetro para los nódulos fibróticos. A medida que la enfermedad progresa, los cordones comienzan a contraerse, causando flexión-deformidades en los dedos (contracturas de flexión) que interfieren y disminuyen la función de la mano.

20

25

La prevalencia de la DD aumenta con la edad y los varones resultan afectados con mayor frecuencia. Se cree que la susceptibilidad genética, el tabaquismo, el alcohol, la diabetes mellitus, la epilepsia y el trabajo manual repetitivo son factores de riesgo comunes para la DD. La gravedad y el progreso de la DD se pueden clasificar por el grado de afectación de flexión-contractura de los dedos.

30

La fasciectomy quirúrgica es actualmente el tratamiento más ampliamente disponible para la DD que proporciona resultados positivos, aunque temporales para la mayoría de los pacientes. Sin embargo, la fasciectomy quirúrgica generalmente implica complicaciones quirúrgicas comunes (por ejemplo, infección, hematoma, pérdida de tejido) así como complicaciones específicas tales como daño de los nervios de los dedos, pérdida de dedos, pérdida de colgajo cutáneo, problemas de curación de heridas y rigidez posoperatoria. Además, la fasciectomy implica una recuperación prolongada y no ofrece una cura definitiva ya que la DD tiene una tasa de recurrencia extremadamente alta. Se han probado procedimientos mínimamente invasivos utilizando agujas o cuchillas delgadas; aunque estos procedimientos causan menos complicaciones, aumentan la tasa de recurrencia. Las intervenciones no quirúrgicas también se han desarrollado e incluyen radioterapia, ultrasonido, inyección de vitamina A, vitamina E, esteroides e interferón-γ.

35

40

Los estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de la colagenasa para disminuir el módulo de tracción y la fuerza necesaria para romper el tejido de cordón de Dupuytren, lo que indica que la colagenasa puede ser efectiva en la fasciotomía enzimática. Los estudios clínicos han demostrado recientemente que el tratamiento con colagenasa de *Clostridium histolyticum* liberó contracturas de DD y mejoró el rango de movimiento en las articulaciones afectadas. Un seguimiento de 8 años de la inyección de colagenasa en pacientes con DD mostró que la contractura MCPJ fue menos severa después de la recurrencia de la enfermedad, en comparación con la contractura inicial antes de aplicar el tratamiento con colagenasa. También se ha demostrado que el colágeno tipo III, que por lo general está ausente de la fascia palmar adulta normal, es abundante en el tejido de pacientes con DD.

45

50

La enfermedad de Peyronie es un trastorno del tejido conectivo que implica el crecimiento de placas fibrosas ricas en colágeno en el tejido blando del pene que afecta hasta el 10% de los hombres. Específicamente, las placas fibrosas se forman en la túnica albugínea, la vaina gruesa del tejido que rodea los cuerpos cavernosos, causa una curvatura anormal que a menudo se asocia con dolor.

55

La cirugía es el único enfoque para tratar la enfermedad de Peyronie que parece tener una eficacia previsiblemente repetible. La cirugía generalmente solo está indicada en casos a largo plazo en los que la enfermedad se estabiliza y la deformidad impide el coito y/o causa dolor extremo. Sin embargo, las complicaciones pueden desarrollarse a partir de la cirugía, incluido un acortamiento permanente del pene.

60

Los enfoques no quirúrgicos para el tratamiento de la enfermedad de Peyronie también están disponibles, aunque son en gran parte ineficaces. Se han intentado disolver las placas mediante inyecciones intralesionales directas. De las metodologías de inyección, aquellas que involucran colagenasa clostridial parecen exhibir una eficacia más constante, aunque todavía bastante limitada en cuanto a su efecto y duración. Además, se han probado la

65

radioterapia y la tecnología láser.

Las patentes US números 5,589,171, 6.086.872 y la patente reemitida US N° RE39,941 divulgan procedimientos para tratar a un individuo que padece la enfermedad de Dupuytren, cuyos procedimientos comprenden aplicar colagenasa a una fascia palmar fibrosa afectada.

La patente US N° 6,022,539 divulga procedimientos para tratar a un individuo que padece la enfermedad de Peyronie, que comprende inyectar colagenasa en una placa fibrosa de Peyronie en el pene del individuo.

La patente de US N° 6,353,028 divulga un medicamento tópico que comprende agentes bloqueadores de los canales de calcio y agentes transportadores que facilitan la administración transdérmica del bloqueador de los canales de calcio para el tratamiento de trastornos del tejido conectivo: enfermedad de Peyronie, enfermedad de Dupuytren y fibrosis de Ledderhose.

La Publicación de Solicitud de Patente US N° 2008/0206228 divulga un medicamento que contiene ácido hialurónico o derivados del mismo en asociación con colagenasa para el tratamiento de diversos tipos de heridas, quemaduras, úlceras de decúbito, úlceras vasculares y úlceras del pie diabético, así como para el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides. El tratamiento de la enfermedad de Dupuytren se divulga explícitamente.

La Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2004/037183 divulga procedimientos y composiciones para el tratamiento de afecciones que implican fibrosis, entre las que se divulgan la enfermedad de Peyronie y la enfermedad de Dupuytren. Las composiciones comprenden un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE)-4, un inhibidor de PDE-5 o un compuesto que eleva cGMP, por indicar algunos.

En la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2005/074913 se divulga el uso de inhibidores del ciclo celular, incluyendo agentes anti-microtúbulos, antimetabolitos, agentes alquilantes, alcaloides de vinca, inhibidores de PDE, metaloproteinasas de matriz que incluyen colagenasas, para tratar una contractura tal como contractura de Dupuytren o contractura de Peyronie.

En ninguna parte de la técnica anterior se divulga o sugiere que las enzimas proteolíticas de fuentes vegetales sean útiles para tratar trastornos del tejido conectivo que implican un exceso de deposición de colágeno.

Se ha descubierto que los extractos derivados del tallo de la planta de piña (*Ananas comosus*) eliminan selectivamente el tejido desvitalizado. Dichos extractos, también llamados bromelina, contienen diversas enzimas proteolíticas e hidrolíticas.

La Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 2006/054309 del Solicitante de la presente invención divulga una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelina que comprende la mayoría de las enzimas proteolíticas presentes en bromelina, las enzimas proteolíticas que tienen un peso molecular promedio de 23 kDa. El documento WO 2006/054309 divulga además usos de dicha composición de desbridamiento para desbridar tejidos no viables.

El documento WO 2009/137897 divulga nanopartículas que contienen papaína, bromelina o ficina para tratar la enfermedad de Peyronie; el documento US 2011/045093 se refiere a una composición farmacéutica aplicada a la terapia de la enfermedad de Peyronie, comprendiendo la composición enzimas proteolíticas vegetales tales como bromelina; y el documento WO 02/074329 divulga una composición farmacéutica que comprende bromelina para el tratamiento de la enfermedad de Peyronie. Ninguno de dichos últimos documentos divulga composiciones que comprendan bromelina de tallo y ananaína para usar en el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo.

Sigue existiendo la necesidad insatisfecha de procedimientos no invasivos mejorados para tratar enfermedades del tejido conectivo que implican un exceso de deposición de colágeno.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto proteolítico para uso en el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo. Particularmente, la composición comprende las cisteína proteasas de la bromelina de tallo EC 3.4.22.32 y ananaína EC 3.4.22.31, y una jectina de tipo jacalina. La enfermedad del tejido conectivo se asocia con un exceso de deposición de colágeno.

Ahora se divulga por primera vez que un extracto proteolítico obtenido a partir de bromelina que comprende una o más de las cisteína proteasas presentes en la bromelina, por ejemplo, la bromelina de tallo o ananaína, es capaz de degradar el colágeno nativo no desnaturalizado. Inesperadamente, la inyección del extracto proteolítico en un cordón de Dupuytren provocó la rotura del cordón mientras se mantenía intacto el tejido conectivo sano normal.

La presente invención divulga además que la eficacia del extracto proteolítico para romper o disolver cordones de Dupuytren es similar o incluso mayor que la de la colagenasa. Sin embargo, aunque la colagenasa puede causar daño a ligamentos o tendones no enfermos debido a su afinidad por los diversos tipos de colágeno, el extracto proteolítico de la presente invención muestra especificidad por los cordones enfermos. Por lo tanto, el extracto proteolítico de la presente invención proporciona un medicamento mejorado y seguro para enfermedades del tejido conectivo que implica un exceso de deposición de colágeno, particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren y la enfermedad de Peyronie.

Debido al hecho de que pueden prepararse altas concentraciones del extracto proteolítico en volúmenes pequeños, tales volúmenes pequeños pueden inyectarse en los cordones o placas fibrosos enfermos, evitando así la extravasación y el daño a los tejidos circundantes, simplificando el procedimiento clínico y, por lo tanto, aumentando el cumplimiento terapéutico por parte del paciente.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un extracto proteolítico para uso en el tratamiento de una enfermedad del tejido conectivo, en el que el extracto proteolítico comprende las cisteína proteasas de la bromelaína de tallo y ananaína, así como una lectina similar a la jacalina, y en la que la enfermedad del tejido conectivo se asocia con un exceso de deposición de colágeno.

De acuerdo con realizaciones adicionales, la enfermedad del tejido conectivo se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, hombro rígido y enfermedad de Ledderhose. De acuerdo con una determinada realización, la enfermedad del tejido conectivo es la enfermedad de Dupuytren. De acuerdo con otra realización, la enfermedad del tejido conectivo es la enfermedad de Peyronie.

De acuerdo con otra realización, el extracto proteolítico comprende además un precursor de cisteína proteasa. De acuerdo con una realización adicional, el extracto proteolítico comprende además un fragmento de cisteína proteasa.

De acuerdo con realizaciones adicionales, la composición farmacéutica comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente anestésico, agente antibacteriano y un agente antiinflamatorio.

De acuerdo con realizaciones adicionales, el agente anestésico se selecciona del grupo que consiste en ametocaína (tetracaína), lignocaína (lidocaína), xilocaína, bupivacaína, prilocaína, ropivacaína, benzocaína, mepivocaína, cocaína y combinaciones de las mismas. Cada posibilidad es una realización separada de la invención.

De acuerdo con realizaciones adicionales, el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de amfanadina, sulfato de amfanadina, amikacina, sulfato de amikacina, amogluosidos, amoxicilina, ampicilina, ampicilinas, bacitracina, betalactamas, candidicina, capreomicina, carbenicilina, cefalexina, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina, cefaloglicina, clorofenicoles, clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorhidrato de clorhexidina, cloroxina, clorquiraldol, clortetraciclina, clorhidrato de clortetraciclina, ciprofloxacina, circulina, clindamicina, clorhidrato de clindamicina, clotrimazol, cloxacilina, demeclociclina, dicloxacilina, diiodohidroxiquina, doxiciclina, etambutol, clorhidrato de etambutol, eritromicina, estolato de eritromicina, estearato de ermicina, farnesol, floxacilina, gentamicina, sulfato de gentamicina, gramicidina, giseofulvina, haloprogina, haloquinol, hexaclorofeno, minociclina, yodoclorhidroxiquina, kanamicina, sulfato de kanamicina, lincomicina, lineomicina, clorhidrato de lineomicina, macrólidos, meclociclina, metaciclina, clorhidrato de metaciclina, metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, metilicina, metonidazol, miconazol, clorhidrato de miconazol, minociclina, clorhidrato de minociclina, mupirocina, nafcilina, neomicina, sulfato de neomicina, netilmicina, sulfato de netilmicina, nitrofurazona, norfloxacin, nistatina, octopirox, oleandomicina, orcefalosporinas, oxacilina, oxitetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, paraclorometaxilenol, paromomicina, sulfato de paromomicina, penicilinas, penicilina G, penicilina V, pentamidina, clorhidrato de pentamidina, feneticilina, polimixinas, quinolonas, sulfato de estreptomomicina, tetraciclina, tobramicina, tolinaftato, triclosán, trifampina, rifamicina, rolitetraciclina, sales de plata, espectinomomicina, espiromicina, estruptomicina, sulfonamida, tetraciclina, tobramicina, sulfato de tobramicina, triclocarbono, triclosán, trimetoprim-sulfametoxazol, tilosina, vancomicina e irotricina. Cada posibilidad es una realización separada de la invención.

De acuerdo con realizaciones adicionales, el agente antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios no esteroideos y agentes antiinflamatorios esteroideos.

De acuerdo con realizaciones adicionales, la composición farmacéutica comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en un agente estabilizante, un antioxidante, un conservante, un agente tamponante, un agente quelante y un agente de tonicidad.

De acuerdo con realizaciones adicionales, la composición farmacéutica se formula en una forma seleccionada del grupo que consiste en una formulación sólida, una formulación semisólida, una formulación líquida y una formulación de espuma. De acuerdo con una cierta realización, la formulación sólida es un polvo. De acuerdo con

otra realización, la formulación líquida es una solución inyectable con un pH de 6 a 7.

De acuerdo con una realización a modo de ejemplo, la composición farmacéutica es adecuada para administrarse mediante inyección en el tejido fibroso enfermo. La composición farmacéutica se puede inyectar como una dosis única o en alícuotas en dos o más ubicaciones en el tejido fibroso enfermo.

Estas y otras realizaciones de la presente invención se entenderán mejor en relación con las figuras, la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones dadas a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un gráfico que muestra la actividad colagenolítica de dos lotes del extracto proteolítico. Se incubaron concentraciones crecientes de los extractos proteolíticos (denominados MD2 H-05-27 y MD5 H-10-46) durante 20 minutos en presencia de colágeno tipo IV marcado fluorescentemente. Al final de la incubación se midió la fluorescencia. Los resultados se presentan en unidades de fluorescencia relativa (RFU).

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la actividad colagenolítica del extracto proteolítico sobre colágeno tipo I y tipo IV. El extracto proteolítico se incubó en presencia de colágeno tipo I fluorescente o colágeno tipo IV durante varios períodos de tiempo. Al final de la incubación se midió la fluorescencia. Los resultados se presentan en unidades de fluorescencia relativa (RFU).

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la actividad colagenolítica del extracto proteolítico en comparación con la colagenasa. Se incubó colagenasa de *Clostridium histolyticum* con colágeno tipo IV marcado fluorescentemente o gelatina marcada fluorescentemente y se midió la fluorescencia al final de los 20 minutos de incubación. El extracto proteolítico se incubó con colágeno tipo IV marcado fluorescentemente durante 20 minutos y luego se midió la fluorescencia.

La **Figura 4** es un gráfico que muestra la actividad de gelatinasa del extracto proteolítico. Se incubaron concentraciones crecientes de dos lotes del extracto proteolítico (designados J-01-19 y J-14-45) durante 20 minutos en presencia de gelatina marcada fluorescentemente y después se midió la fluorescencia.

Las **Figuras 5A-C** son fotografías que muestran la extirpación quirúrgica del cordón de Dupuytren de un paciente. La **Figura 6A** es una fotografía que muestra la contractura anormal del dedo anular en un paciente con enfermedad de Dupuytren. La **Figura 4B** es una fotografía que muestra la extirpación quirúrgica del cordón patológico. La **Figura 4C** es una fotografía que muestra el cordón después de sacarlo del lecho palmar.

La **Figura 6** es una fotografía que muestra la disección del cordón de Dupuytren en dos.

La **Figura 7** es una fotografía que muestra el anclaje del cordón.

La **Figura 8** es una fotografía que muestra la etapa de inyección de una solución en el cordón de Dupuytren.

La **Figura 9** es una fotografía que muestra la máquina de estiramiento a tracción.

Las **Figuras 10A-B** son fotografías que muestran el cordón antes y después de la aplicación de la fuerza de tracción. La **Figura 10A** muestra el cordón antes de la aplicación de la fuerza de tracción. La **Figura 10B** muestra el cordón después de la aplicación de la fuerza de tracción y antes de la ruptura del cordón.

La **Figura 11** muestra el efecto de la solución salina en el alargamiento del cordón de Dupuytren como una función de la aplicación de resistencia a la tracción. El cordón de Dupuytren se inyectó con solución salina y se incubó en solución salina durante 24 horas. Posteriormente, el cordón se sometió a tensión de tracción y se evaluó el alargamiento y la rotura del cordón.

La **Figura 12** muestra el efecto del extracto proteolítico sobre el alargamiento del cordón de Dupuytren como una función de la aplicación de resistencia a la tracción. El cordón de Dupuytren se inyectó con el extracto proteolítico y se incubó en presencia del extracto proteolítico durante 24 horas. Posteriormente, el cordón se sometió a tensión de tracción y se evaluó el alargamiento y la rotura del cordón.

La **Figura 13** muestra el efecto de una inyección única del extracto proteolítico en el alargamiento del cordón de Dupuytren como una función de la aplicación de resistencia a la tracción. Los cordones de Dupuytren se inyectaron con el extracto proteolítico y se incubaron en solución salina durante 24 horas. Posteriormente, los cordones se sometieron a tensión de tracción y se evaluó el alargamiento y la rotura del cordón.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades del tejido conectivo que implican un exceso de deposición de colágeno.

Una composición de desbridamiento obtenida a partir de bromelina (también denominada Debrase®) se describió por primera vez en el documento WO 2006/054309 del Solicitante de la presente invención. La composición de desbridamiento descrita en el documento WO 2006/054309 comprende cisteína proteasas tales como bromelina de tallo y ananaína. El documento WO 2006/054309 divulga además que la composición de desbridamiento desbridaba la piel quemada, es decir, el tejido desvitalizado, más eficazmente que la bromelina. Sin embargo, se descubrió que la composición de desbridamiento era inactiva al desbridar pieles o dermis sanas o vitales (véase, por ejemplo, Singer et al., 2010, *J. Burn Care Res.* 31: 304-309). Por lo tanto, se demostró que la composición de desbridamiento era activa contra tejidos desvitalizados, no contra tejidos viables.

De forma inesperada, la presente invención divulga que un extracto proteolítico obtenido a partir de la bromelaína ejerció actividad colongenolítica *in vitro* y fue capaz de disolver los cordones fibróticos palmares obtenidos de sujetos que padecen la enfermedad de Dupuytren. Dado que el extracto proteolítico de la presente invención no degrada el tejido conectivo sano, de este modo la presente invención proporciona un medicamento enzimático seguro y efectivo para disolver tejido fibroso rico en colágeno, específicamente en sujetos que padecen la enfermedad de Dupuytren o la enfermedad de Peyronie.

Los términos "extracto proteolítico obtenido a partir de bromelina" y "extracto proteolítico" se usan indistintamente en toda la memoria descriptiva y en las reivindicaciones y se refieren a una preparación enzimática parcialmente purificada a partir de bromelina.

El término "bromelina" se refiere a cualquiera de varias preparaciones de polvo de bromelina actualmente disponibles comercialmente. Entre los ejemplos de fabricantes de bromelina se incluyen Sigma y Challenge Bioproducts Co. Ltd., Taiwán. La bromelina se prepara a partir del tallo de la planta de piña. Un procedimiento típico para obtener bromelaína es el siguiente: el jugo del tallo de la planta de piña primero se ajusta a un pH de aproximadamente 3 o 4 con ácido fosfórico, y se agrega hidruro de sodio o sulfhidruro de sodio para proteger contra la oxidación de sulfhidrilo. El material inerte se precipita a aproximadamente 30% de acetona y, después de la filtración, el fluido clarificado se precipita con 70% de acetona. Este precipitado se recoge por centrifugación y se redisuelve en agua que contiene hidruro de sodio o sulfhidruro de sodio que se ha acidificado con ácido fosfórico y se reprecipita, o se seca en un horno de vacío directamente. Si el material se vuelve a precipitar, se utiliza un 70% de acetona. El material seco de cualquier proceso es adecuado como material de partida para obtener la composición de desbridamiento de la presente invención.

El extracto proteolítico de la presente invención (también denominado Debrase® o Nexobrid®) comprende las cisteína proteasas de la bromelina de tallo (EC 3.4.22.32) y ananaína (EC 3.4.22.31). El extracto proteolítico puede comprender además uno o más de los precursores de cisteína proteasa de la bromelina, tales como, por ejemplo, el precursor de la ananaína (EC 3.4.22.31), el precursor de la bromelina de la fruta (EC 3.4.22.33) y el precursor de la bromelina de tallo (EC 3.4.22.31). El extracto proteolítico comprende además una lectina de tipo jacalina (véase, por ejemplo, Raval et al., *Glycobiology*, 2004, 14(12): 1247-1263). El extracto proteolítico puede comprender además inhibidores de bromelina y/o fragmentos de cisteína proteasa (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/054309).

El extracto proteolítico se puede preparar mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- (a) suspender la bromelina con una solución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante, teniendo la solución ácida un pH en el intervalo de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 4;
- (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 4;
- (c) agregar un coadyuvante de filtración a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) para eliminar los componentes insolubles;
- (e) añadir a la solución filtrada de (d) sal de sulfato de amonio para producir la saturación de sulfato de amonio en el intervalo de aproximadamente 40% a aproximadamente 50%;
- (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4;
- (g) incubar la suspensión de (f) a 3 °C-10 °C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para producir un precipitado de sulfato de amonio;
- (i) disolver el precipitado de sulfato de amonio en una solución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 4;
- (j) filtrar la solución de (i) a través de un ultrafiltro de 10 kDa; y
- (k) liofilizar la solución retenida de (j).

La suspensión de bromelaína puede realizarse en cualquier solución ácida que tenga un pH entre aproximadamente 2,4 a 4. Los ejemplos de soluciones o tampones ácidos que se pueden usar incluyen ácido acético en agua, tampón de acetato y tampón de acetato que contiene ácido tioglicólico al 1%, con pH de 2,4-4.

La solución ácida puede seleccionarse de los tampones y soluciones descritos en las patentes US números 5,830,739 y 4,197,291.

5 La solución ácida puede comprender opcionalmente un antioxidante. Ejemplos de antioxidantes incluyen ácido ascórbico, dihidroquinona, hidroxitolueno butilado y ditiotreitól. El antioxidante se puede agregar a una concentración de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%, preferentemente a 1%.

10 La solución ácida puede comprender además un agente humectante. Los ejemplos de agentes humectantes incluyen n-octanol.

El pH de la solución ácida, que opcionalmente comprende un antioxidante, puede estar en el intervalo de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 4. El pH de la solución ácida, que opcionalmente comprende un antioxidante, también puede variar de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 2,6.

15 Se puede agregar un coadyuvante de filtración a la suspensión de (a). El coadyuvante de filtración puede comprender sílice. Preferentemente, el coadyuvante de filtración es diatomita natural que se calcina de modo que se consiguen caudales más rápidos.

20 La precipitación de las proteínas deseadas se realiza añadiendo a la solución filtrada de la sal del sulfato de amonio de la etapa (d). Se puede añadir sal de sulfato de amonio para producir la saturación del sulfato de amonio en un intervalo de entre aproximadamente 40% a aproximadamente 50%. Preferentemente, se puede agregar una sal de sulfato de amonio para producir 40% de saturación de sulfato de amonio.

25 La suspensión de la etapa (f) se incuba luego a una temperatura entre 3 °C y 10 °C. Preferentemente, la suspensión de la etapa (f) se incuba durante al menos 10 horas a temperaturas entre 3 °C a 10 °C. Más preferentemente, la suspensión de la etapa (f) se incuba durante 12-24 horas a 4°C.

30 Al final de la incubación, la suspensión de la etapa (g) se centrifuga para precipitar las proteínas deseadas, es decir, las enzimas proteolíticas. El precipitado se disuelve a continuación en una solución ácida que comprende opcionalmente un antioxidante. La suspensión puede incubarse durante al menos 10 horas a 4 °C.

35 La solución de la etapa (i) se somete a una etapa de filtración para retener las enzimas proteolíticas que tienen pesos moleculares superiores a aproximadamente 10 kDa. La solución de la etapa (i) se puede filtrar a través de un filtro de membrana que tiene un corte de peso molecular de aproximadamente 10 kDa.

40 El extracto proteolítico se puede liofilizar después de la filtración, se puede lavar con agua destilada y luego se puede liofilizar o se puede filtrar y luego liofilizar. El extracto proteolítico puede filtrarse a través de una membrana de filtro con un tamaño de poro de al menos aproximadamente 0,5 µm para obtener una solución estéril, que luego se liofiliza y almacena. Preferentemente, el extracto proteolítico se almacena como un polvo liofilizado ya que su estabilidad se prolonga en ausencia de humedad. Antes de su uso, el extracto proteolítico se disuelve en una solución para obtener una solución con un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.

El extracto proteolítico se puede preparar mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 45 (a) suspender bromelina con ácido acético 0,3 M que comprende 1% de ácido ascórbico y n-octanol con un pH de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 2,6;
- (b) ajustar la suspensión de (a) a un pH en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5;
- (c) añadir un coadyuvante de filtración que comprende sílice a la suspensión de (b);
- (d) filtrar la suspensión de (c) a través de un filtro prensa para eliminar los componentes insolubles;
- 50 (e) añadir a la solución filtrada de (d) sal de sulfato de amonio (285 g/l) para producir 40% de saturación de sulfato de amonio;
- (f) ajustar la suspensión de (e) a un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5;
- (g) incubar la suspensión de (f) durante aproximadamente 12-24 horas a 4 °C;
- (h) centrifugar la suspensión de (g) para producir un precipitado de sulfato de amonio;
- (i) disolver el precipitado de sulfato de amonio en ácido acético 0,3 M que comprende ácido ascórbico al
- 55 1% que tiene un pH de aproximadamente 2,4 a aproximadamente 2,6;
- (j) filtrar la solución de (i) a través de un ultrafiltro de 10 kDa;
- (k) filtrar la solución retenida de (j) para producir una solución estéril; y
- (l) liofilizar la solución filtrada de (k).

60 El término "enfermedad de Dupuytren" y "DD" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a una enfermedad en la que los dedos no pueden extenderse completamente y normalmente se flexionan hacia la palma de la mano. Específicamente, la enfermedad de Dupuytren comienza con la formación de nódulos fibromatosos en la fascia palmar, generalmente en el lado cubital. Los nódulos progresan y forman una banda o cordón fibroso que se extiende desde la palma hasta los dedos. Eventualmente, esto conduce a contracciones permanentes de flexión de los dedos. El dedo anular es el más comúnmente afectado, seguido por el dedo

meñique.

Los términos "cordón de Dupuytren" y "cordón enfermo" se usan en la presente memoria indistintamente y se refieren a las bandas de fibras fasciales que discurren longitudinalmente debajo de la piel palmar. Estas bandas conducen a contracturas de la piel superpuesta y los dedos distales que se unen a las bandas y, finalmente, progresa a una flexión-contractura permanente de los dedos afectados. Típicamente, el cordón de Dupuytren comprende un gran número de fibroblastos, mayor depósito de proteínas de matriz extracelular (ECM), particularmente colágeno y miofibroblastos.

Debe entenderse que el extracto proteolítico de la invención es útil para tratar individuos que tienen otras enfermedades asociadas con un exceso de deposición de colágeno. Otras malformaciones y anomalías del tejido fibroso que involucran la deposición de colágeno incluyen la enfermedad de Peyronie, la fibrosis de Ledderhose y la fibrosis de las cápsulas articulares, los tendones y las vainas de los ligamentos. Por lo tanto, el extracto proteolítico también puede ser útil para tratar el hombro rígido (capsulitis adhesiva). Estas enfermedades del tejido conectivo que involucran el exceso de deposición de colágeno o malformaciones del tejido fibroso no están asociadas con heridas o quemaduras.

Como se usa en la presente memoria, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a la mejora o eliminación de al menos uno o más de los síntomas asociados con una enfermedad del tejido conectivo. Por ejemplo, los síntomas asociados con la enfermedad de Dupuytren incluyen contractura articular, disminución del rango de movimiento de las articulaciones, para enumerar algunos. Los síntomas de la enfermedad de Peyronie incluyen, por ejemplo, dolor, curvatura anormal y disfunción eréctil.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" del extracto proteolítico es la cantidad del extracto proteolítico que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al que se administra la composición.

El término "aproximadamente" cuando se refiere a un pH de una solución o suspensión pretende indicar que 0,5 unidades de pH por encima o por debajo del pH indicado están dentro del alcance de la presente invención.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender el extracto proteolítico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia regulatoria del gobierno federal o estatal o enlistado en la farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, excipiente o portador con el que se administra el extracto proteolítico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros solventes sintéticos. Las soluciones salinas, la solución acuosa de NaCl/CaCl₂, la dextrosa acuosa, las soluciones de glicerol y las soluciones de albúmina pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. El agua también puede usarse como un vehículo cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

La composición farmacéutica puede comprender además agentes estabilizantes tales como lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, silicato de calcio, polivinilpirrolidona y celulosa. La composición puede incluir adicionalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; conservantes tales como timerosal, alcohol bencílico, parabenos, metil- o propilhidroxibenzoatos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, dihidroquinona, hidroxitolueno butilado y ditiotreitól; y agentes tamponantes tales como fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, benzoato de sodio, benzoato de potasio, citrato de sodio, acetato de sodio y tartrato de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa.

La composición farmacéutica puede comprender además un agente anestésico.

Los agentes anestésicos incluyen ametocaína (tetracaína), lignocaína (lidocaína), xilocaína, bupivacaína, prilocaína, ropivacaína, benzocaína, mepivocaína, cocaína y combinaciones de las mismas.

La composición farmacéutica puede comprender además un agente antibacteriano.

Los agentes antibacterianos incluyen clorhidrato de amfanfadina, sulfato de amfanfadina, amikacina, sulfato de amikacina, amoglucosidos, amoxicilina, ampicilina, amsamincinas, bacitracina, betalactámicos, candicidina, capreomicina, carbenicilina, cefalexina, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina, cefaloglicina, clorofenicoles, clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorhidrato de clorhexidina, cloroxina, clorquiraldol,

clortetraciclina, clorhidrato de clortetraciclina, ciprofloxacina, circulina, clindamicina, clorhidrato de clindamicina, clotrimazol, cloxacilina, demeclociclina, dicloxacilina, diiodohidroiquina, doxiciclina, etambutol, clorhidrato de etambutol, eritromicina, estolato de eritromicina, estearato de ermicina, farnesol, floxacilina, gentamicina, sulfato de gentamicina, gramicidina, giseofulvina, haloprogina, haloquinol, hexaclorofeno, minociclina, yodoclorhidroiquina, kanamicina, sulfato de kanamicina, lincomicina, lineomicina, clorhidrato de lineomicina, macrólidos, meclociclina, metaciclina, clorhidrato de metaciclina, metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, metilicina, metonidazol, miconazol, clorhidrato de miconazol, minociclina, clorhidrato de minociclina, mupirocina, nafcilina, neomicina, sulfato de neomicina, netilmicina, sulfato de netilmicina, nitrofurazona, norfloxacina, nistatina, octopirox, oleandomicina, orcefalosporinas, oxacilina, oxitetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, paraclorometaxilenol, paromomicina, sulfato de paromomicina, penicilinas, penicilina G, penicilina V, pentamidina, clorhidrato de pentamidina, feneticilina, polimixinas, quinolonas, sulfato de estreptomycin, tetraciclina, tobramicina, tolnaftato, triclosán, trifampina, rifamicina, rolitetraciclina, sales de plata, espectinomicina, espiamicina, estruptionomicina, sulfonamida, tetraciclina, tetraciclina, tobramicina, sulfato de tobramicina, triclocarbono, triclosán, trimetoprim-sulfametoxazol, tilosina, vancomicina e irotricina.

De acuerdo con otra realización adicional, la composición farmacéutica puede comprender además un agente antiinflamatorio.

El agente antiinflamatorio puede ser no esteroideo, esteroideo o una combinación de los mismos. Ejemplos de agentes antiinflamatorios no esteroideos incluyen, oxicams, tales como piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam; salicilatos, como aspirina, disalcid, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal y fendosal; derivados de ácido acético, tales como diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepac, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acematacina, fentiazac, zomepirac, clindanac, oxepinac, felbinac y ketorolaco; fenamatos, como los ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico y tolfenámico; derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, mioprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno y tiaprofeno; pirazoles, como fenilbutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona. También se pueden emplear extractos de estos agentes antiinflamatorios no esteroideos.

Ejemplos de fármacos antiinflamatorios esteroideos incluyen, corticosteroides tales como hidrocortisona, hidroxil-triamcinolona, alfa-metil dexametasona, dexametasona-fosfato, beclometasona dipropionatos, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de fluclorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluosinolona, fluocinonida, butílicos de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednidenol (fluprednidenol), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, fluradrenolona, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el resto de sus ésteres, cloroprednisona, acetato de cloroprednisona, clocortelona, clescinnolona, diclorisona, difluprednato, fluclorolona, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona y extractos de los mismos.

La composición farmacéutica se puede formular como una formulación seca o liofilizada, formulación semisólida, formulación líquida o una formulación de espuma. Por lo tanto, la composición farmacéutica se puede formular en forma de un polvo, solución, suspensión, emulsión, gel, pulverización o un parche.

La composición farmacéutica puede administrarse en el sitio afectado por vía tópica, subcutánea, intracutánea o intramuscular.

De acuerdo con una determinada realización, la composición farmacéutica es adecuada para administrarse por inyección. La composición farmacéutica se puede inyectar directamente en los nódulos o cordones fibrosos enfermos o en la placa fibrosa. Alternativamente, la composición farmacéutica se puede implantar en una incisión quirúrgica. Las preparaciones inyectables estériles se pueden formular como soluciones acuosas o suspensiones oleaginosas como se conoce en la técnica.

Para uso tópico en la piel, la composición farmacéutica se puede formular en forma de una pomada, crema, loción, pasta, pulverización o aerosol. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen vaselina, aquaphor, neobase, propilenglicol, glicerina y similares. También se pueden usar combinaciones de dos o más de estos vehículos.

La composición farmacéutica se puede formular como formulaciones de liberación controlada o sostenida que permiten la liberación prolongada de los componentes activos durante un período de tiempo predeterminado. La composición farmacéutica puede administrarse en combinación con un implante polimérico biocompatible y biodegradable, que libera el extracto proteolítico durante un período de tiempo controlado en un sitio seleccionado. Ejemplos de materiales poliméricos incluyen polianhidridos, poliortoésteres, ácido poliglicólico, ácido poliláctico,

polietilen vinil acetato, copolímeros y mezclas de los mismos (véase, Aplicaciones médicas de liberación controlada, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla.). Alternativamente, la composición farmacéutica se aplica tópicamente como un gel. Ejemplos de materiales poliméricos que se pueden usar son polisacáridos, particularmente derivados de celulosa tales como, por ejemplo, hidroxipropil celulosa, carboximetil

celulosa e hidroxietil celulosa, quitina, quitosano y alginatos. La formulación del gel permitiría la liberación prolongada de los componentes activos durante un período de tiempo predeterminado.

La composición farmacéutica se puede formular como espuma. Los propelentes de gas se utilizan para generar y administrar una composición espumable como espuma. Los ejemplos de propelentes de gas adecuados incluyen hidrocarburos volátiles tales como butano, propano, isobutano o mezclas de los mismos, y gases fluorocarbonados. La composición puede ser una emulsión acuosa de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite, que comprende además un agente estabilizante. El agente estabilizante aumenta la viscosidad de la composición, puede contribuir a la estabilidad de la composición y/o ralentiza la velocidad de colapso de la espuma. Ejemplos de agentes estabilizantes incluyen materiales poliméricos naturales (por ejemplo, alginato, albúmina, carragenano, goma de xantano, almidón), materiales poliméricos semisintéticos tales como éteres de celulosa (por ejemplo, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), y materiales poliméricos sintéticos (por ejemplo, poli(alcohol vinílico), polímeros de carboxivinilo y polivinilpirrolidona).

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Remington: Farmacia), Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

La composición farmacéutica se puede administrar como una dosis única, o en alícuotas en dos o más ubicaciones en el tejido fibroso afectado. La cantidad del extracto proteolítico a administrar es una cantidad efectiva que ablanda y/o rompe la placa. Una cantidad efectiva del extracto proteolítico puede variar de aproximadamente 0,2 mg/día a aproximadamente 40 mg/día. La composición farmacéutica puede administrarse en dos o más alícuotas, cada una de las cuales comprende aproximadamente 0,5-1,5 mg, opcionalmente en 0,2-0,5 ml de solución o suspensión.

El órgano en el que se puede administrar la composición farmacéutica que comprende el extracto proteolítico se puede inmovilizar durante varias horas, por ejemplo, de 2 a 12 horas.

Cada posibilidad descrita en la memoria descriptiva es una realización separada de la invención.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar una comprensión más completa de la invención. Las técnicas, condiciones, materiales, proporciones y datos reportados específicos expuestos para ilustrar los principios de la invención se proporcionan a modo de ejemplo y no deben interpretarse como limitativos del ámbito de la invención.

Ejemplo 1

La actividad colagenolítica del extracto proteolítico

El extracto proteolítico se obtuvo a partir de bromelaína como se divulga en el documento WO 2006/054309.

En primer lugar, se determinó la capacidad de dos lotes de Debrase para degradar el colágeno tipo IV. El ensayo se basó en el Kit de Ensayo de Gelatinasa/Colagenasa EnzChek® (Invitrogen) que contenía colágeno tipo IV DQ™ marcado con fluoresceína como sustrato. Se sabe que este sustrato es digerido eficientemente por colagenasas para producir péptidos altamente fluorescentes. El aumento en la fluorescencia es proporcional a la actividad proteolítica.

Para cada pocillo, se añadió un tampón de reacción Debrase (Tris-HCl 0,15 M y EDTA 10 mM, pH 7,6) para obtener un volumen final de 100 µl. A continuación, se añadieron a los pocillos 10 µl de 0,5 µg/µl de solución de colágeno tipo IV DQ™. A continuación, se añadieron diferentes volúmenes (10-80 µl) de Debrase recién preparado a una concentración de 0,225-1 ng/µl a los pocillos en tampón Debrase para alcanzar concentraciones de 1,5-20 ng/pocillo. El tampón Debrase se usó como control negativo. La placa de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para detener la reacción, se añadieron 20 µl de solución de parada de reacción (ácido iodoacético 0,324 mM en tampón Debrase). La intensidad de fluorescencia se midió mediante un lector de microplacas de fluorescencia (Analyst AD, LJL) equipado con filtros de fluoresceína estándar. Se sustrajo la fluorescencia de fondo de los pocillos incubadas en ausencia de enzima.

La **Figura 1** muestra la actividad colagenolítica de dos lotes de Debrase. Como se muestra en la figura, los dos lotes de Debrase ejercieron una actividad colagenolítica similar, lo que indica que el procedimiento experimental para obtener el extracto proteolítico de la presente invención produce preparaciones enzimáticas consistentes.

A continuación, se determinó la capacidad del extracto proteolítico para degradar los tipos de colágeno I y IV. Para ese fin, se usaron como sustratos colágeno tipo IV DQ™ y colágeno tipo I DQ marcado con fluoresceína. El ensayo

se realizó como se divulga anteriormente y continuó durante los periodos de tiempo indicados en la **Figura 2**. La reacción se detuvo mediante la adición de 20 µl de solución de reacción de parada (ácido yodoacético 0,324 mM en tampón Debrase) y se midió la intensidad de fluorescencia como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

La colagenasa purificada a partir de *Clostridium histolyticum* sirvió como un control positivo con actividad predefinida (se definió una unidad como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 micromol de equivalentes de E-leucina a partir de colágeno en 5 horas a 37 °C, pH 7,5).

Para el ensayo con colagenasa de *Clostridium histolyticum*, se añadió un tampón de reacción para colagenasa (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM, azida sódica 0,2 mM, pH 7,6) para obtener un volumen final de 100 µl por cada pocillo. Posteriormente, diferentes volúmenes (10 - 80 µl) de colagenasa de Clostridium, 0.4 - 1 mU/µl, en tampón de colagenasa de Clostridium fueron agregados a los pocillos de referencia para alcanzar concentraciones que varían de 5 a 80 mU/pocillo. Para detener la reacción de colagenasa de Clostridium, se añadieron 20 µl de 1 mg/ml de 1,10-fenantrolina en tampón de colagenasa.

Los datos de colagenasa de Clostridium se usaron como un valor de referencia por mUnidad. Los datos de las muestras de extracto proteolítico (también llamado Debrase) se dividieron por el valor de referencia para determinar mU/ng de Debrase.

La **Figura 2** muestra que el extracto proteolítico degradaba el colágeno tipo I y IV con una actividad específica de 1.58 y 1.27 mU/ng, respectivamente.

A continuación, se comparó la actividad del extracto proteolítico con la actividad colágena de *Clostridium histolyticum* contra el colágeno. La actividad proteolítica de la colagenasa contra la gelatina también se midió usando el Kit de Ensayo de Gelatinasa/Colagenasa EnzChek® (Invitrogen) y gelatina DQ™ (Invitrogen) como sustrato.

La **Figura 3** muestra que el extracto proteolítico ejerce una actividad colagenolítica contra el colágeno tipo IV, actividad que es más alta que la obtenida por la colagenasa comercialmente disponible contra el colágeno.

La **Figura 4** muestra que el extracto proteolítico ejerce actividad de gelatinasa. Como se muestra en la figura, la actividad de gelatinasa del extracto proteolítico fue lineal en un intervalo de concentración de 2-8 ng/pocillo.

Ejemplo 2

El extracto proteolítico facilita la ruptura del cordón de Dupuytren

Se obtuvieron cordones de Dupuytren de pacientes sometidos a fasciotomía (**Figuras 5A, 5B y 5C**). Los formularios de consentimiento fueron firmados por todos los sujetos antes de la cirugía y el estudio fue aprobado por un comité de Helsinki. El experimento examinó la capacidad del extracto proteolítico para realizar fasciectomía del cordón.

Preparación de tejidos

Los cordones obtenidos de los pacientes se dividieron en dos o tres piezas, dependiendo de su longitud (**Figura 6**). Los cordones se conectaron mediante la técnica de Krackov a un dispositivo de ensayo mecánico a través de una sutura de polipropileno prolene 1 (Ethicon, Somerville, NJ) (**Figura 7**). Uno de los dos cordones se inyectó con el extracto proteolítico (0,3-0,5 ml del extracto proteolítico de acuerdo con el tamaño del cordón) y el segundo cordón de control se inyectó con solución salina (**Figura 8**). Los cordones del grupo de extracto proteolítico se sumergieron en la solución de extracto proteolítico y los cordones del grupo de control se sumergieron en solución salina. Ambos grupos se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

Ensayos mecánicos

Después de 24 horas de incubación, todos los cordones se conectaron a un dispositivo mecánico de ensayo de esfuerzo de tracción (sistema de ensayo Zwick 1445, Zwick Co., Alemania). Cada cordón se sometió a una carga creciente hasta que se rompió el cordón o la sutura de conexión. El dispositivo midió la fuerza de tracción aplicada hasta la ruptura.

Análisis histológico

Se obtuvo una muestra de cada espécimen para el análisis histológico y para la determinación de la etapa de la enfermedad.

Análisis estadístico

La eficacia del grupo de control en comparación con el grupo de estudio se probó usando el ensayo exacto de Fisher.

5

Resultados

Todos los cordones tratados con el extracto proteolítico (n = 10) se rompieron después del estiramiento (**Figuras 10A y 10B**). Algunos de los cordones tratados con el extracto proteolítico estaban casi completamente rotos, prácticamente disueltos antes del ensayo mecánico. Todos los cordones de control (n = 9) no se rompieron después de la aplicación de la fuerza de tracción. Como se representa en la **Figura 11**, todos los cordones de control exhibieron un patrón de alargamiento de tensión similar representado por un alargamiento limitado con un esfuerzo creciente del cordón hasta que se rompió cuando se aplicó una carga muy alta. Por el contrario, todos los cordones tratados con el extracto proteolítico exhibieron pérdida de la resistencia a la tracción del cordón, culminando en la rotura del cordón con un esfuerzo muy bajo (**Figura 12**). Los resultados demostraron que dosis bajas, es decir, 0,8 mg/ml, del extracto proteolítico eran capaces de romper los cordones de enfermedades de Dupuytren y que este efecto se demostró adicionalmente a dosis más altas del extracto proteolítico, es decir, hasta 150 mg/ml.

10

15

Con el fin de evaluar el efecto de una inyección única del extracto proteolítico sobre el estiramiento del cordón de Dupuytren, se inyectaron los cordones con el extracto proteolítico en tres sitios diferentes a lo largo del cordón y luego se incubaron en solución salina en ausencia del proteolítico extracto durante 24 horas a 37 °C.

20

La **Figura 13** muestra que las inyecciones del extracto proteolítico administradas en tres sitios de los cordones de Dupuytren fueron capaces de reducir la resistencia a la tracción de los cordones en un factor de 4 a 5 (véase la **Figura 13**, los ensayos 1a y 2 que muestran la ruptura del cordón). con una tracción de 18 N y 15 N, respectivamente). Un cordón (**Figura 13**, ensayo 1b) se sometió a ruptura con una tracción de 0,4 N. Estos resultados demuestran la eficacia del extracto proteolítico para disolver cordones de Dupuytren e implican claramente que el extracto proteolítico de la presente invención es un medicamento enzimático altamente efectivo para la enfermedad de Dupuytren, así como otras enfermedades del tejido conectivo que implican un exceso de deposición de colágeno.

25

30

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un extracto proteolítico para su uso en el tratamiento de una enfermedad del tejido conectivo, en la que el extracto proteolítico comprende las cisteína proteasas de la bromelina de tallo EC 3.4.22.32 y ananaína EC 3.4.22.31, y una jectina de tipo jacalina, en la que la enfermedad del tejido conectivo se asocia con un exceso de deposición de colágeno.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad del tejido conectivo se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, hombro rígido y enfermedad de Ledderhose.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad del tejido conectivo es la enfermedad de Dupuytren.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad del tejido conectivo es la enfermedad de Peyronie.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el extracto proteolítico comprende además al menos un precursor de cisteína proteasa.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente anestésico, agente antibacteriano y un agente antiinflamatorio.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el agente anestésico se selecciona del grupo que consiste en ametocaína (tetracaína), lignocaína (lidocaína), xilocaína, bupivacaína, prilocaína, ropivacaína, benzocaína, mepivocaína, cocaína y combinaciones de las mismas.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el agente antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en clorhidrato de amfanfagina, sulfato de amfanfagina, amikacina, sulfato de amikacina, amoglucosidos, amoxicilina, ampicilina, amsamicinas, bacitracina, betalactamas, candidicina, capreomicina, carbenicilina, cefalexina, cefaloridina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefradina, cefaloglicina, clorofenicoles, clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorhidrato de clorhexidina, cloroxina, clorquiraldol, clortetraciclina, clorhidrato de clortetraciclina, ciprofloxacina, circulina, clindamicina, clorhidrato de clindamicina, clotrimazol, cloxacilina, demeclociclina, dicloxacilina, diyodohidroxiquina, doxiciclina, etambutol, clorhidrato de etambutol, eritromicina, estolato de eritromicina, estearato de ermicina, farnesol, floxacilina, gentamicina, sulfato de gentamicina, gramicidina, giseofulvina, haloprogina, haloquinol, hexaclorofeno, minociclina, yodoclorhidroxiquina, kanamicina, sulfato de kanamicina, lincomicina, lineomicina, clorhidrato de lineomicina, macrólidos, meclociclina, metaciclina, clorhidrato de metaciclina, metenamina, hipurato de metenamina, mandelato de metenamina, meticilina, metonidazol, miconazol, clorhidrato de miconazol, minociclina, clorhidrato de minociclina, mupirocina, nafcilina, neomicina, sulfato de neomicina, netilmicina, sulfato de netilmicina, nitrofurazona, norfloxacina, nistatina, octopirox, oleandomicina, orcefalosporinas, oxacilina, oxitetraciclina, clorhidrato de oxitetraciclina, paraclorometaxilenol, paromomicina, sulfato de paromomicina, penicilinas, penicilina G, penicilina V, pentamidina, clorhidrato de pentamidina, feneticilina, polimixinas, quinolonas, sulfato de estreptomina, tetraciclina, tobramicina, tolnaftato, triclosán, trifampina, rifamicina, rolitetraciclina, sales de plata, espectinomicina, espiamicina, estruptionicina, sulfonamida, tetraciclina, tetraciclina, tobramicina, sulfato de tobramicina, triclocarbono, triclosán, trimetoprim-sulfametoxazol, tilosina, vancomicina e irotricina.
- 45 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el agente antiinflamatorio se selecciona del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios no esteroideos y agentes antiinflamatorios esteroideos.
- 50 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además un componente seleccionado del grupo que consiste en un agente estabilizante, un antioxidante, un conservante, un agente tamponante, un agente quelante y un agente de tonicidad.
- 55 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica se formula en una forma seleccionada del grupo que consiste en una formulación sólida, una formulación semisólida, una formulación líquida y una formulación de espuma.
- 60 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la formulación sólida es un polvo; o en la que la formulación líquida es una solución inyectable con un pH de 6 a 7.
- 65

13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica es adecuada para ser administrada mediante inyección en el tejido fibroso enfermo.

5 **14.** La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13,
en la que la composición farmacéutica se formula para inyectarse como una dosis única; o
en la que la composición farmacéutica se formula para inyectarse en alícuotas en dos o más ubicaciones en
el tejido fibroso enfermo.

10

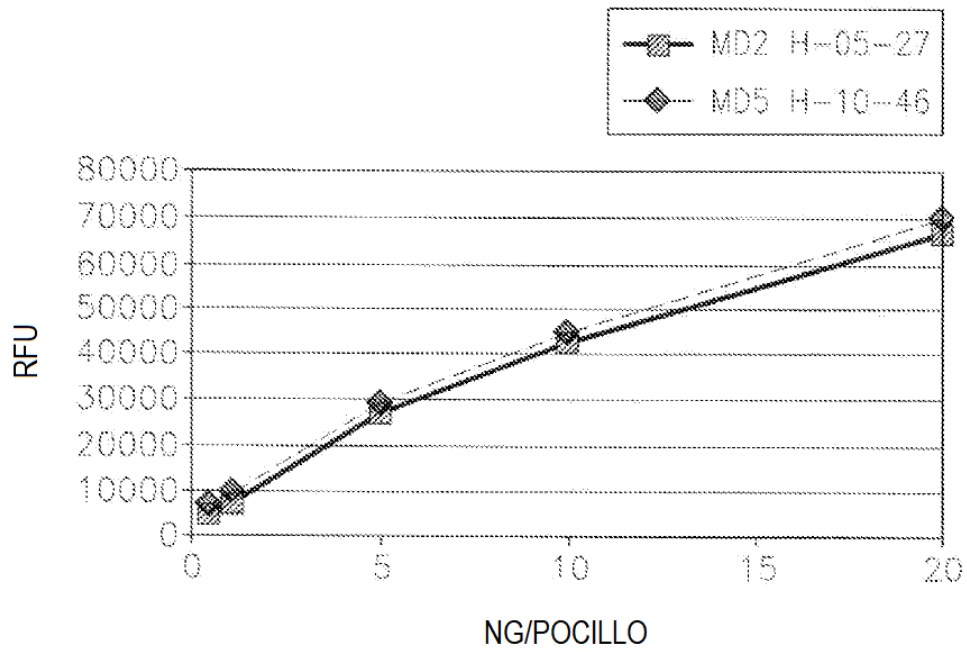


FIG. 1

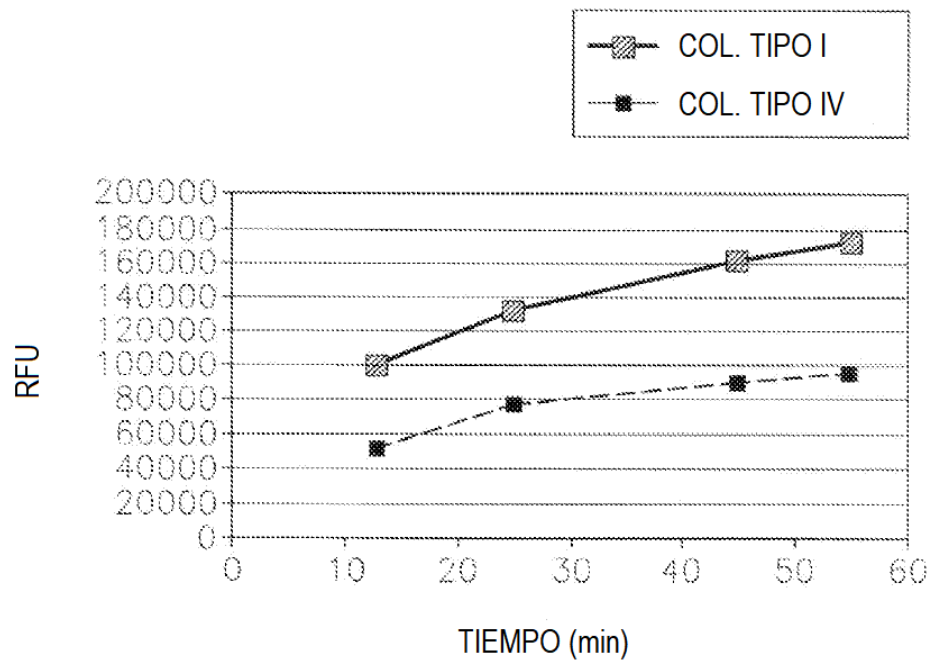


FIG. 2

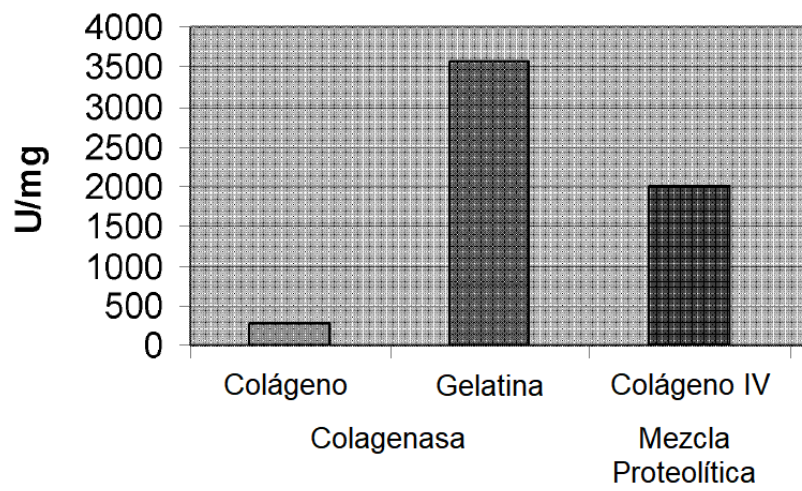


FIG. 3

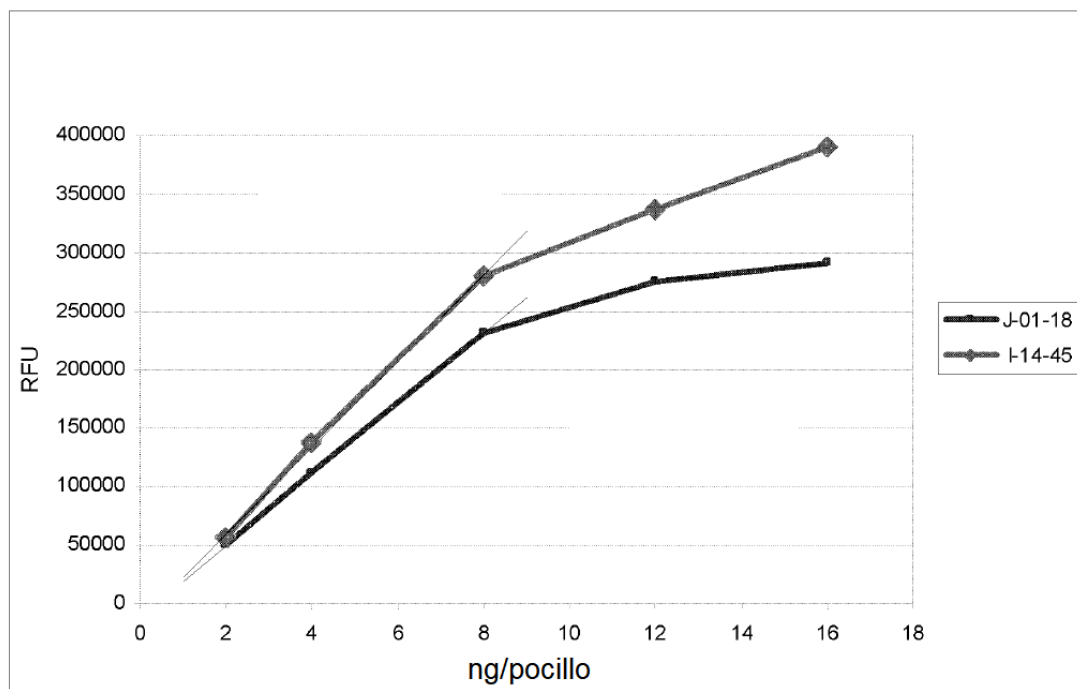


FIG. 4

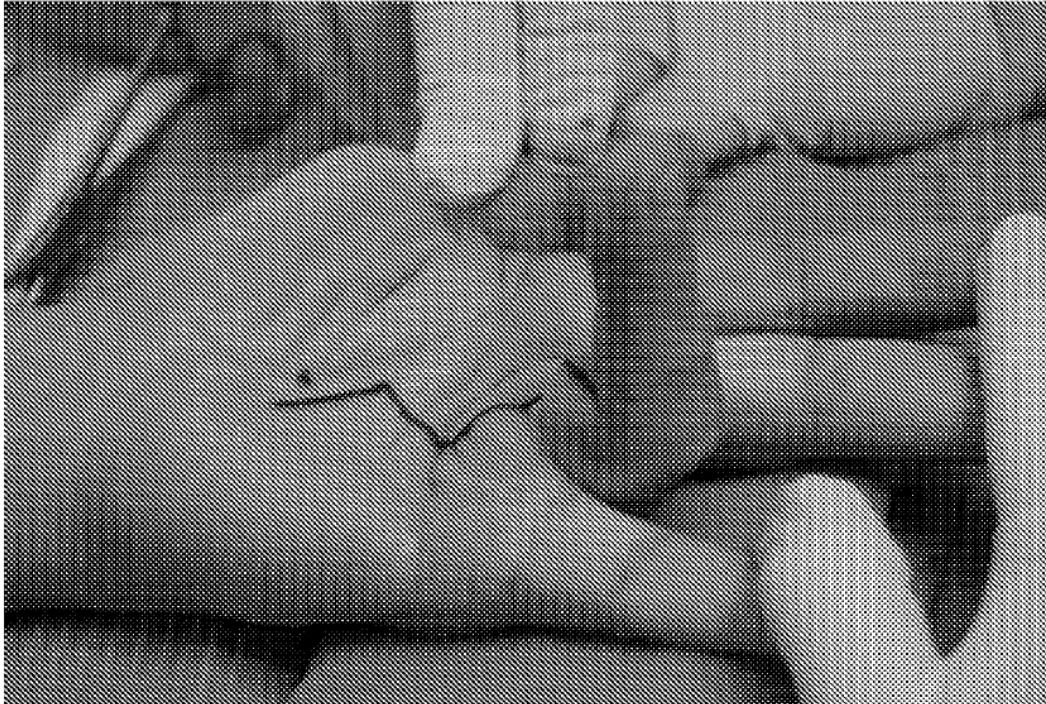


FIG. 5A

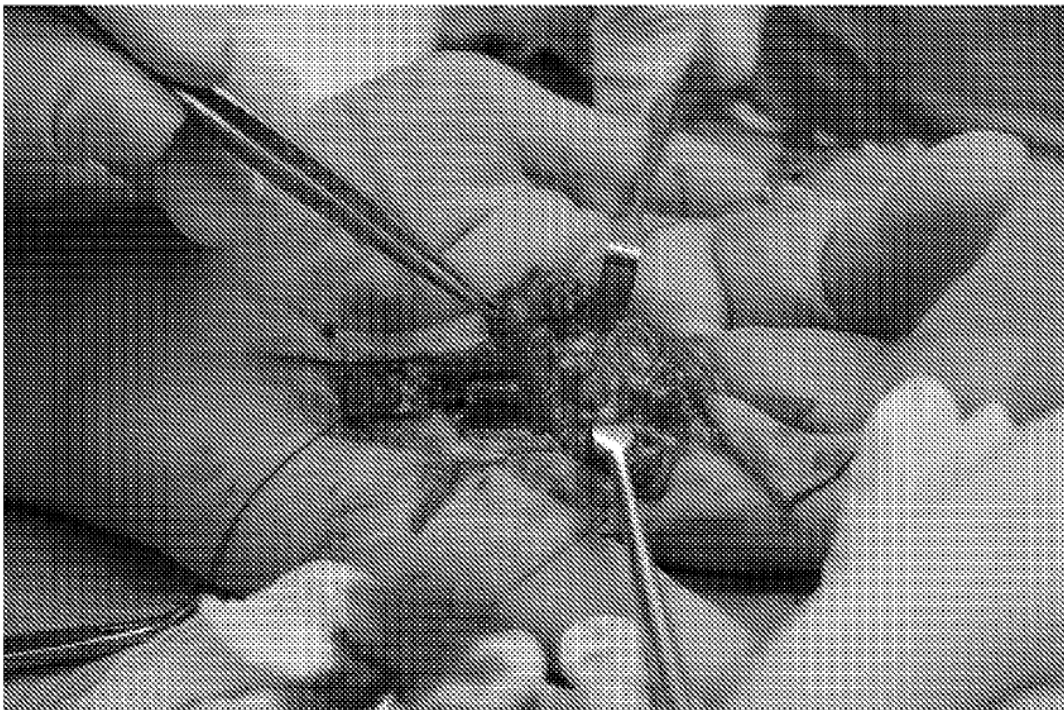


FIG. 5B



FIG. 5C

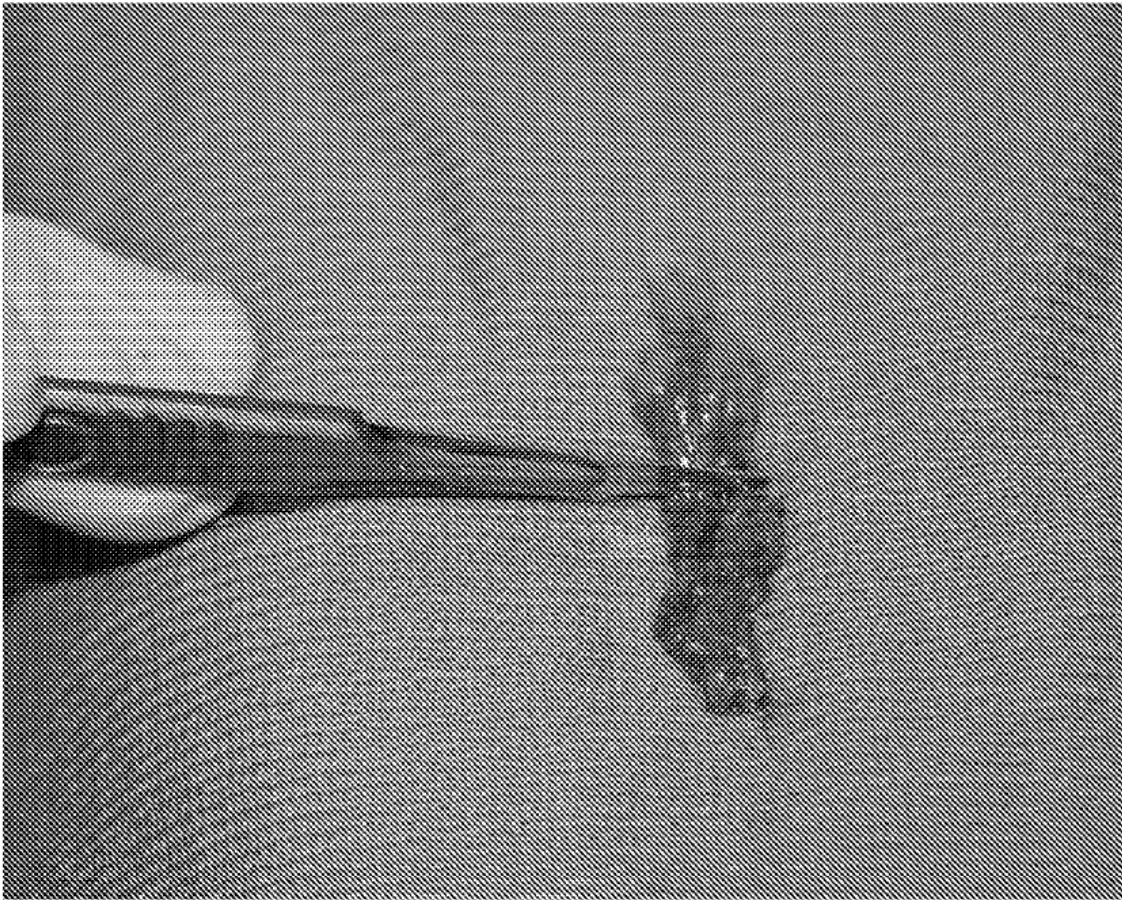


FIG. 6

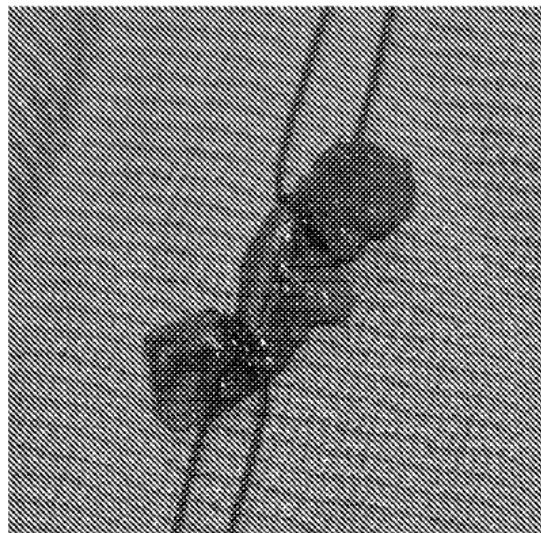


FIG. 7

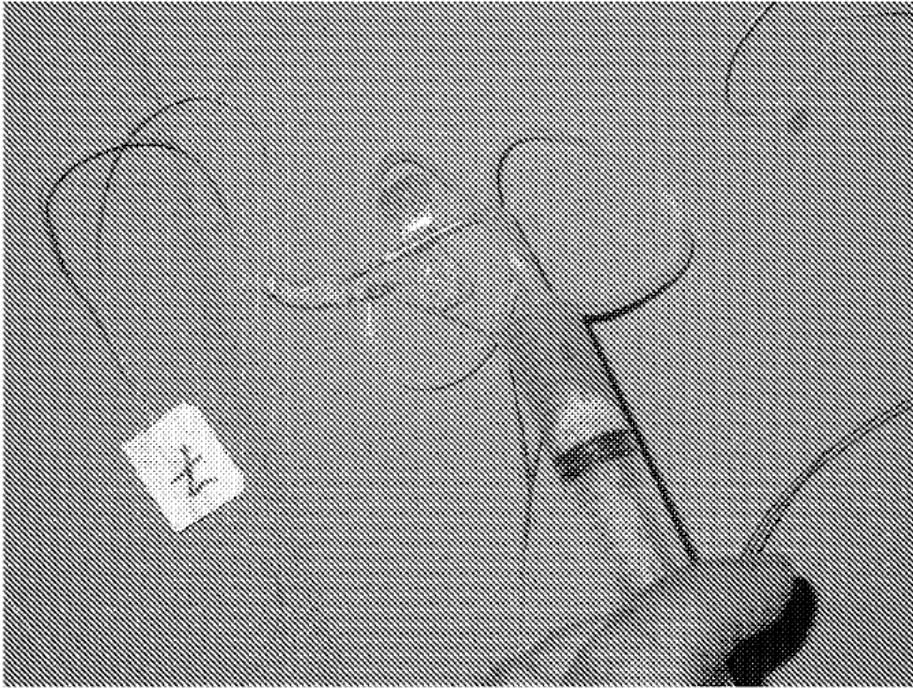


FIG. 8

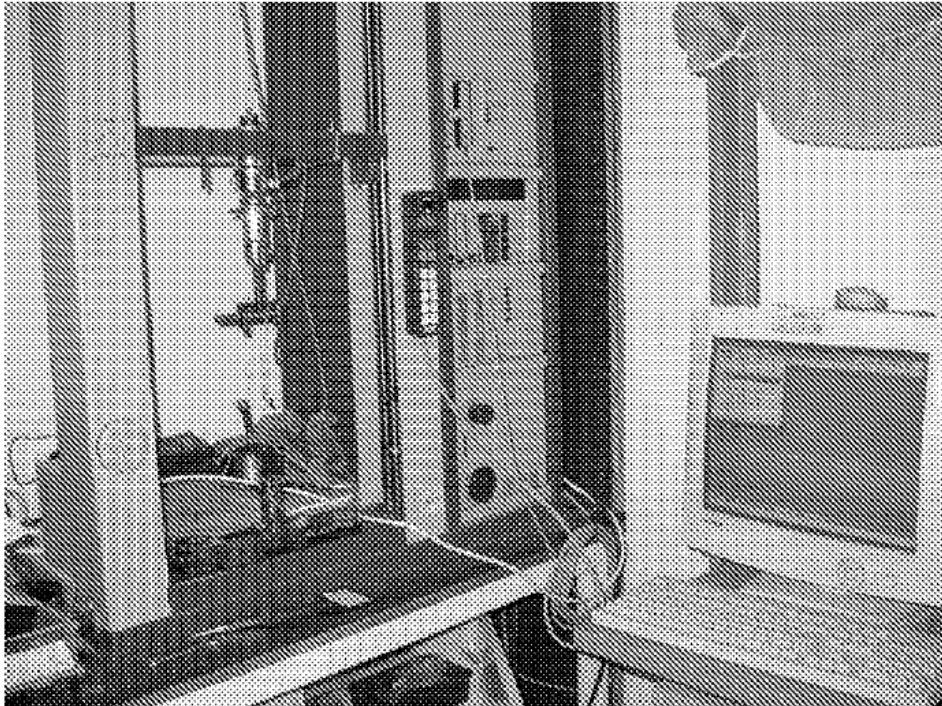


FIG. 9

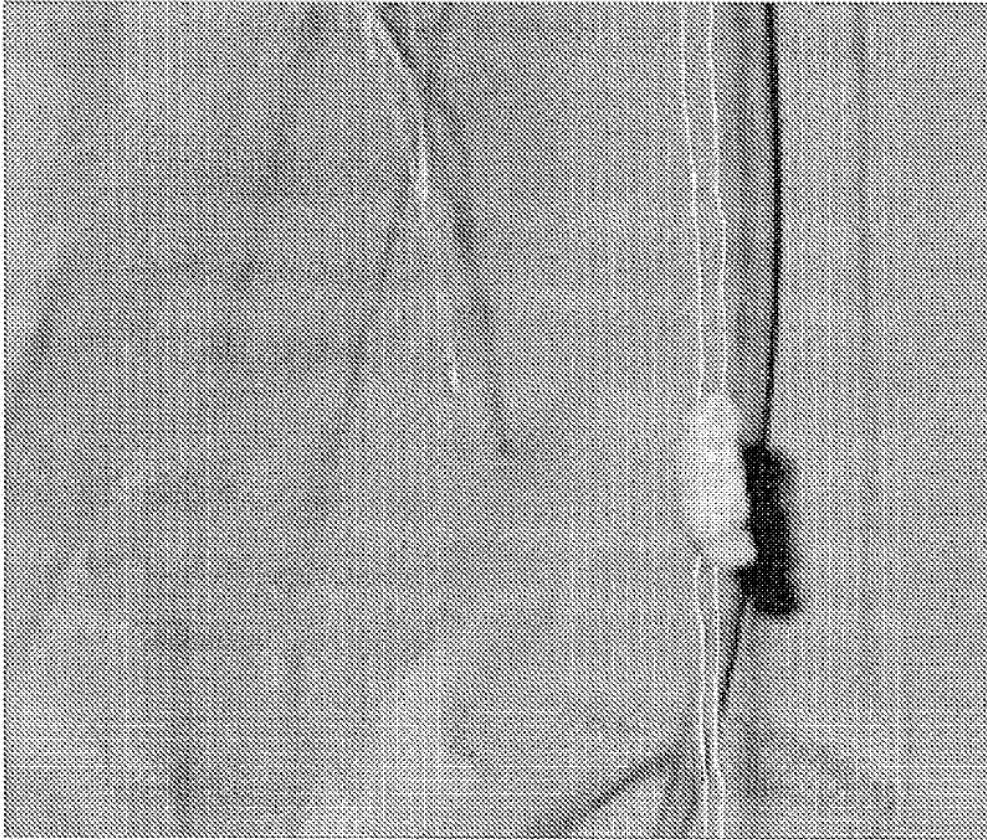


FIG. 10A

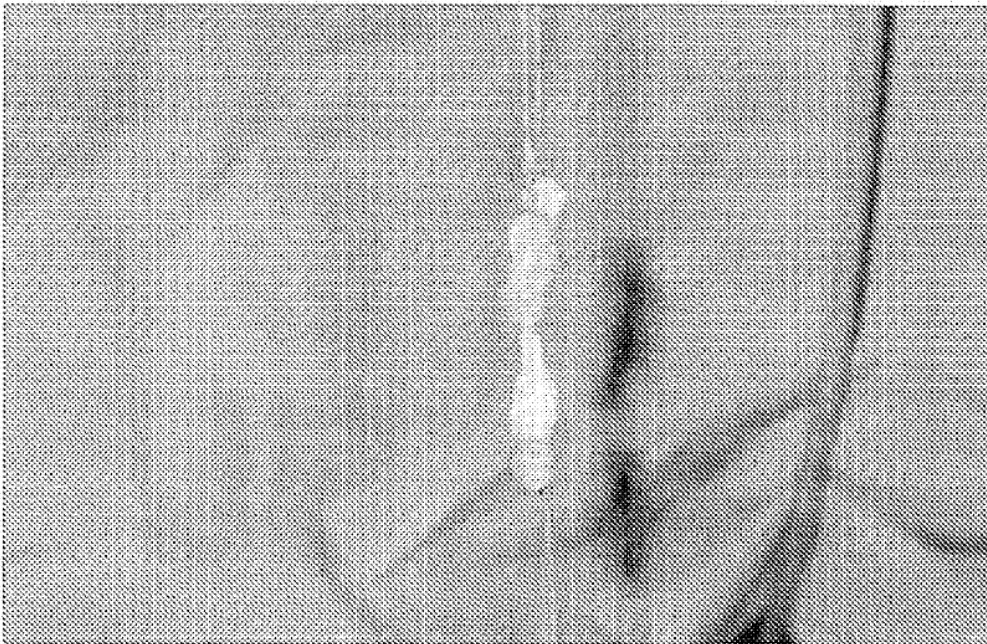


FIG. 10B

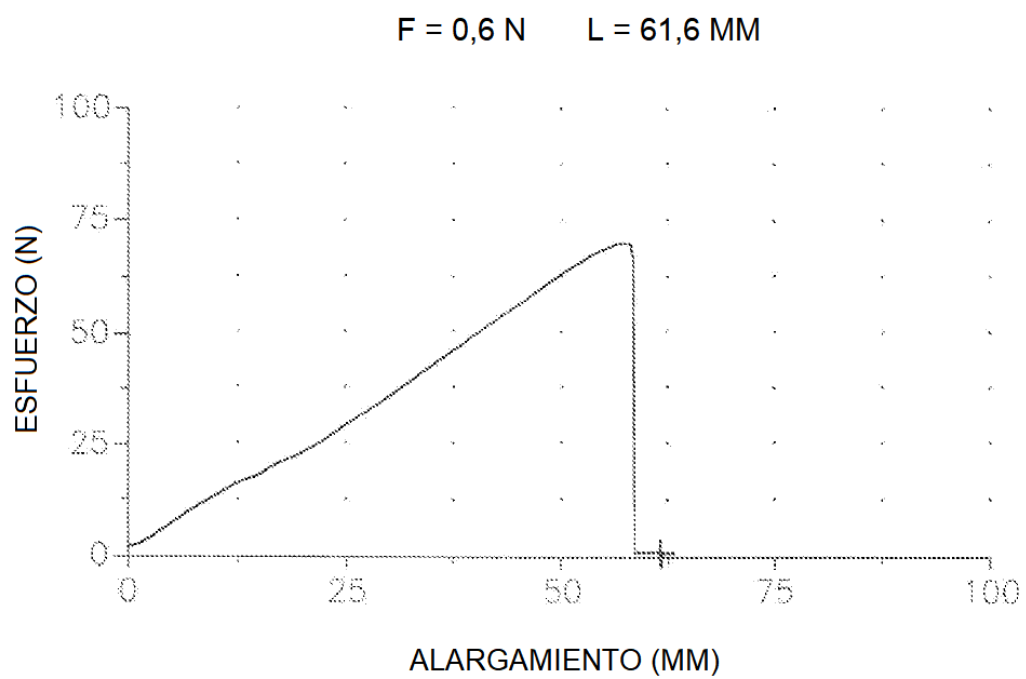


FIG. 11

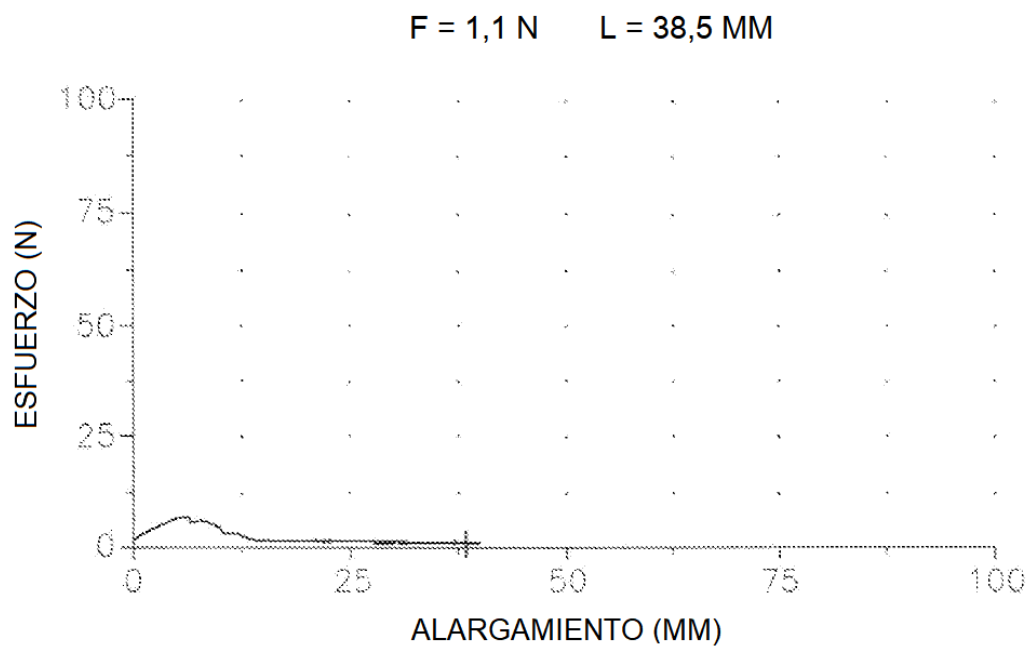


FIG. 12

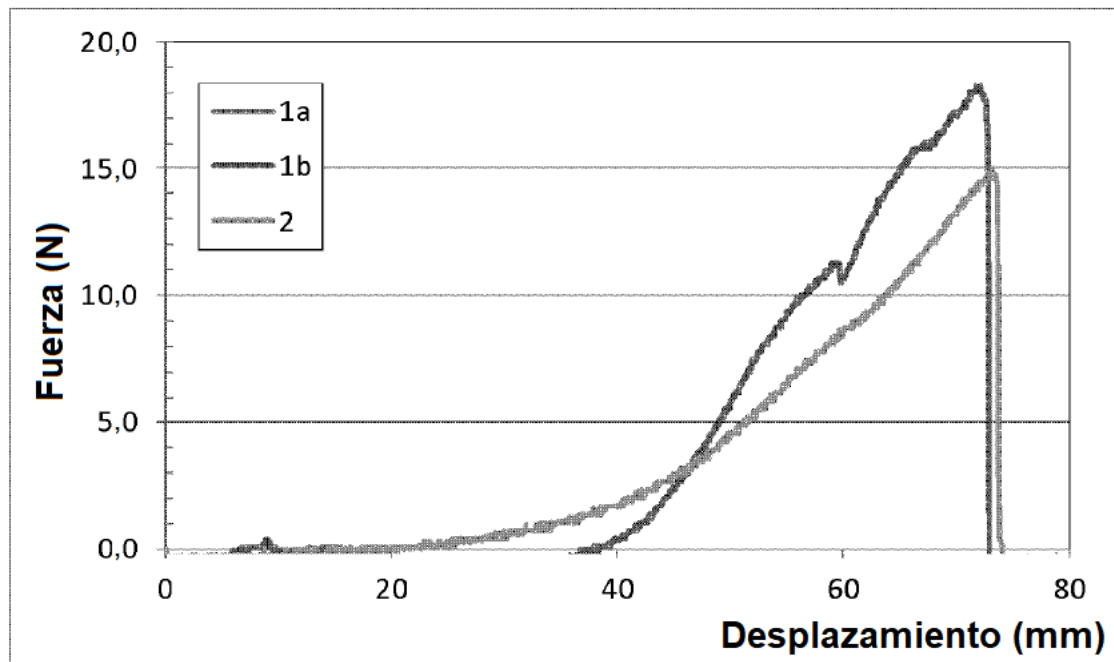


FIG. 13