

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 476**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61Q 19/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012 PCT/US2012/061063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059619**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012 E 12842537 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2768523**

54 Título: **Método para el tratamiento o reducción de PFE**

30 Prioridad:

21.10.2011 US 201161549863 P

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

11.02.2020

73 Titular/es:

**ENDO GLOBAL VENTURES (100.0%)
22 Victoria Street, Canon's Court
Hamilton HM12, BM**

72 Inventor/es:

HART, SUSAN G., EMEIGH

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 741 476 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

Método para el tratamiento o reducción de PFE.

5 Antecedentes de la invención

La paniculopatía fibrosclerótica edematosa (PFE), más comúnmente conocida como celulitis, es una condición que presenta una alteración topográfica en la apariencia de la piel y afecta al 90% de las mujeres después de la pubertad (Rawlings (2006), Int J Cosmetic Sci 2006; 28: 175-90; Khan et al. (2010), J Am Acad Dermatol 2010; 62: 361-70). La PFE aparece como piel con hoyuelos y le da a la piel lo que comúnmente se describe como una apariencia de piel de naranja. Se cree que los septos dérmicos, compuestos de colagenasa, desempeñan un papel causante en la formación de hoyuelos en la piel.

La colagenasa, es una enzima que tiene la capacidad específica para digerir el colágeno, se ha utilizado para tratar una variedad de enfermedades mediadas por el colágeno, que incluyen, por ejemplo, la contractura de Dupuytren, la enfermedad de Peyronie, el lipoma y la capsulitis adhesiva. La Patente de EE. UU No., 4.645,668 y solicitud de patente de EE. UU. Pub. No. 20070224184 también revela ciertos usos de la colagenasa. Una fuente importante de colagenasa es la fermentación de la bacteria, *Clostridium histolyticum*. Una formulación inyectable que comprende colagenasa I y colagenasa II de *C. histolyticum* se vende con el nombre comercial XIAFLEX® y está aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la contractura de Dupuytren.

Sumario de la Invención

La presente invención está basada en el descubrimiento de que una o más inyecciones de colagenasa de baja dosis en un área afectada por PFE son eficaces para reducir o tratar a dicha PFE. La cantidad de colagenasa en una sola inyección puede ser tan baja como de 5 unidades ABC, o 0.00029 mg (0.29 µg). La dosis total de la colagenasa administrada depende del tamaño del área de tratamiento y, por lo tanto, puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 5000 unidades ABC. La concentración de colagenasa puede estar entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC/mililitro (ml). 10,000 unidades ABC son equivalentes a 0.58 mg de colagenasa.

La invención está dirigida a un método cosmético para tratar o reducir la PFE en un paciente que comprende las etapas de: proporcionar una composición farmacéutica que comprende a un portador farmacéuticamente aceptable, colagenasa I y colagenasa II en una proporción de masa 1:1 con una actividad específica de 10,000 unidades ABC por 0.58 mg de colagenasa y administración por inyección subdérmica a dicho paciente, 5-200 unidades ABC por inyección de la composición farmacéutica en un área afectada por PFE, en donde cuando se administran múltiples inyecciones, los sitios de inyección son de aproximadamente 1 a unos 4 cm el uno del otro. En ciertos aspectos, se administra una pluralidad de inyecciones subdérmicas en una pluralidad de sitios de inyección. En realizaciones adicionales, la concentración de colagenasa administrada está entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC por mililitro. En ciertas realizaciones adicionales, cada inyección de colagenasa se administra en un volumen de aproximadamente 0.5 ml o menos. En un aspecto adicional, la dosis total de la colagenasa administrada está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 2000 unidades ABC.

En la presente se describe un método para tratar o reducir a la PFE en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una o una pluralidad de inyecciones subdérmicas de colagenasa dentro de un área afectada por la PFE, en donde la dosis total de colagenasa administrada al área afectada se encuentra entre aproximadamente 5 a aproximadamente 5000 unidades ABC, y en el que la pluralidad de inyecciones se administra en una pluralidad de sitios de inyección. Cada inyección puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 unidades ABC. La concentración de colagenasa administrada puede estar entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC por mililitro y/ o cada inyección de colagenasa puede administrarse en un volumen de aproximadamente 0.5 ml o menos.

También se describe en la presente un método para tratar o reducir a la PFE en un paciente que comprende la administración a dicho paciente una o una pluralidad de inyecciones subdérmicas de colagenasa a un área afectada por la PFE, en donde la dosis de colagenasa administrada por inyección a la el área afectada está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 unidades ABC y en donde la concentración de colagenasa administrada en el área afectada está entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC por mililitro.

En la presente también se describe un método para tratar o reducir a la PFE en un paciente que comprende administrar una o una pluralidad de inyecciones subdérmicas de colagenasa en un área afectada por la PFE en la que la concentración de colagenasa administrada en el área afectada está entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC por mililitro y el que el volumen de cada inyección de colagenasa es de aproximadamente 0.5 ml o menos.

En algunas realizaciones, la dosis de colagenasa administrada por inyección está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 unidades ABC. En realizaciones adicionales, la dosis de colagenasa administrada por inyección está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 unidades ABC.

La colagenasa puede derivarse de una fuente bacteriana o puede ser una forma recombinante de la colagenasa. En algunas realizaciones, la colagenasa se purifica a partir de *Clostridium histolyticum*. La colagenasa para uso en la invención comprende colagenasa I y colagenasa II. En otras realizaciones adicionales, la colagenasa es colagenasa I y colagenasa II purificada a partir de *Clostridium histolyticum* y comprende a colagenasa I y colagenasa II.

Breve descripción de las figuras

Los anteriores y otros propósitos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en las figuras adjuntas, en los que los caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes en todos los diferentes puntos de vista. Las figuras no están necesariamente a escala, sino que se pone énfasis en ilustrar los principios de la invención.

La Figura 1 es una representación de la plantilla de inyección donde cada punto dentro del octágono representa a un sitio de inyección. La X dentro del círculo representa el sitio de inyección al "hoyuelo central". Las cuatro esquinas están etiquetadas como superior derecha (SD), inferior derecha (ID), superior izquierda (SI) e inferior izquierda (II).

La Figura 2 es una representación de glúteos y de la parte posterior superior del muslo con marcas en la esquina de la plantilla.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se proporciona una descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

Como se discutió anteriormente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que las inyecciones de colagenasa en dosis bajas en un área afectada por PFE son efectivas para lisar al colágeno y, por lo tanto, reducir o tratar a dicha PFE. La cantidad de colagenasa en una sola inyección puede ser tan baja como 5 unidades ABC, o 0.00029 mg. La dosis total de colagenasa administrada depende del tamaño del área de tratamiento y, por lo tanto, está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 5000 unidades ABC y/o en donde la concentración de colagenasa está entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2000 unidades ABC/mililitro (ml). Las dosis y concentraciones de la colagenasa empleadas de acuerdo con el método de la presente invención son sustancialmente más bajas que las dosis y concentraciones de colagenasa actualmente utilizadas y aprobadas por la FDA de Estados Unidos para el tratamiento de la contractura de Dupuytren.

Las palabras "un" o "una(o)" están destinadas a abarcar una o más, a menos que se especifique lo contrario.

El "tratar" o "tratamiento" de PFE incluye la administración de las composiciones o agentes descritos en el presente documento para mejorar la apariencia de la piel previamente afectada por PFE y/o lograr un mejor resultado estético. El tratamiento de la PFE puede, por ejemplo, abarcar una reducción visual de la gravedad de la PFE o una reducción visual de la gravedad o el número de hoyuelos de la piel.

En este documento se describe un método para tratar o reducir la PFE en un paciente que comprende administrar una o varias inyecciones subdérmicas de colagenasa en un área afectada por la PFE, en donde la pluralidad de inyecciones se inyecta en una pluralidad de sitios de inyecciones dentro de un área afectada por PFE, en donde la dosis de colagenasa administrada por inyección es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 unidades ABC. En realizaciones adicionales, la dosis de colagenasa por inyección es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 unidades ABC, o aproximadamente de 5 a aproximadamente de 50 unidades ABC, o aproximadamente 10 a aproximadamente 100 unidades ABC, o aproximadamente de 10 a aproximadamente 50 unidades ABC. En realizaciones adicionales, la dosis total de colagenasa administrada en el área afectada está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 5000 unidades ABC. En el presente documento se describe un método que comprende administrar colagenasa al área afectada por PFE en la que la concentración de colagenasa administrada en el área afectada es de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 unidades ABC/ml. En el presente documento también se describe un método para tratar o reducir a la PFE en un paciente que comprende administrar una pluralidad de inyecciones de colagenasa a un área afectada por la PFE, en donde la dosis de colagenasa por inyección es de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 unidades ABC.

Un área afectada por PFE (también denominada aquí "área diana" o "área de tratamiento") es típicamente un área de la piel en los muslos y/o glúteos caracterizada por uno o más hoyuelos. En algunas realizaciones, el área de PFE tratada con una o varias inyecciones de colagenasa es un área de la cara lateral superior del muslo o un área de los glúteos y no implica el pliegue glúteo. El área diana a tratar con colagenasa también puede ser un área con una escala de severidad de PFE fotonumérica (CSS) con una puntuación de ≥ 10 que representa una gravedad de PFE de moderada a grave dentro del glúteo derecho o izquierdo o en el muslo derecho o izquierdo (Hexsel et al. 2009. A validated photonumeric EFP severity scale. JEADV 2009; 23: 523-52). La CSS es una escala fotonumérica que analiza cinco características morfológicas clave de la PFE: (A) número de depresiones, (B) profundidad de las depresiones, (C) aspecto morfológico de la superficie de la piel, (D) laxitud, flacidez o laxitud de la piel, y (E) la escala de clasificación descrita originalmente por Nümberger y Müller, J Dermatol Surg Oncol 1978; 4(3): 221-29. (Hexsel et al., 2009). Cada

una de estas características se evalúa en una escala de 4 puntos desde un mínimo de 0 hasta un máximo de 3. El intervalo de la escala varía de 0 a 15.

El área diana tratada con una o varias inyecciones de PFE es generalmente un área de la piel caracterizada por uno o más hoyuelos que son visualmente evidentes cuando el paciente está de pie. El área geométrica del área de tratamiento depende del tamaño del área afectada por la PFE. Así, por ejemplo, si el área afectada por PFE incluye a un hoyuelo, el área geométrica del área diana puede ser de aproximadamente 1 cm² a aproximadamente 5 cm². En aspectos adicionales, el área afectada por PFE comprende múltiples hoyuelos y tiene un área geométrica superior a 1 cm². En una realización, el área diana tiene un área geométrica de entre aproximadamente 1 cm² y aproximadamente 200 cm². Como se entenderá, dado que el área diana es generalmente un área del muslo o los glúteos, el área puede, por ejemplo, tener una forma ásperamente rectangular y tener una longitud de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 cm, y una anchura de aproximadamente 1 a unos 10 cm. En un ejemplo adicional, el área diana tiene una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 15 cm y un ancho de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 cm. Un experto en la técnica también entenderá que el área diana puede ser ásperamente circular o cualquier otra forma geométrica dependiendo del área deseada para el tratamiento. El área diana puede estar opcionalmente caracterizada por al menos un hoyuelo de piel aproximadamente en el centro del área de la PFE tratada, en donde el área de PFE se trata con una o una pluralidad de inyecciones. Los sitios para la inyección de la colagenasa pueden ser numerados y espaciados dentro del área afectada por la PFE, para permitir la distribución y eficacia uniforme de la colagenasa inyectada. El número de inyecciones de colagenasa dependerá generalmente del tamaño del área a tratar. En algunas realizaciones, el número de sitios de inyección es de al menos 1 o más. En otros aspectos, el número de sitios de inyección es de al menos aproximadamente 5 o más. En otros aspectos, el número de sitios de inyección es de al menos aproximadamente 7 o más. En un aspecto adicional, el número de sitios de inyección es de al menos 10 o más.

En una realización, en la que el área a tratar es un área con un hoyuelo única o que de otra manera tiene un área geométrica de menos de aproximadamente 5 cm², solo hay un sitio único de inyección, y se inyectan entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 unidades ABC de la colagenasa. Opcionalmente, la inyección única se puede inyectar en el centro del hoyuelo. En realizaciones en las que el área de tratamiento es mayor, habrá múltiples sitios de inyección y se administrarán entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 unidades ABC de colagenasa por inyección. Opcionalmente, la pluralidad de inyecciones incluye al menos una inyección administrada en el centro de un hoyuelo. Cuando se administran múltiples inyecciones de acuerdo con la invención, los sitios de inyección están de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm entre sí. En aún otros aspectos, los sitios de inyección pueden estar a una distancia de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 cm. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el área afectada por la PFE tiene un ancho de aproximadamente 8 cm y una longitud de aproximadamente 10 cm en dimensiones, y el número de inyecciones de colagenasa administradas es de 10 y la distancia entre los sitios de inyección es de aproximadamente 2.5 cm. En ciertos aspectos, una plantilla de inyección (por ejemplo, hecha de un material claro y delgado) que incluye marcas que muestran los sitios de inyección previstos se coloca sobre el área diana y la una o más inyecciones se realizan en los sitios indicados por la plantilla.

El área diana se trata con una o una pluralidad de inyecciones concurrentes de colagenasa. Como se utiliza en la presente, las inyecciones concurrentes son inyecciones administradas al mismo tiempo o secuencialmente dentro del mismo período de tiempo, es decir, durante una única sesión de tratamiento. Como se discutió anteriormente, la dosis total de colagenasa administrada al área afectada por PFE puede estar entre aproximadamente 5 y aproximadamente 5000 unidades ABC de colagenasa. La dosis total de colagenasa administrada depende del tamaño del área de tratamiento. La dosis total de colagenasa es la suma de las dosis administradas utilizando una o varias inyecciones de colagenasa. En ciertos aspectos, cada inyección de colagenasa comprenderá dosis iguales de colagenasa. Por ejemplo, cuando el número de inyecciones es 10, que se distribuirá en el área de tratamiento, y cada inyección es de 200 unidades ABC de colagenasa, la dosis total de colagenasa que se administrará en el área diana será de 2000 unidades ABC. A modo de ejemplo adicional, cuando el número de inyecciones es 10 para distribuir en el área de tratamiento, y cada inyección es de 5 unidades ABC de colagenasa, la dosis total de colagenasa que se administrará en el área diana será de 50 unidades ABC. A modo de ejemplo adicional, cuando el número de inyecciones es de 5 para distribuir en el área de tratamiento, y cada inyección es de 5 unidades ABC de colagenasa, la dosis total de colagenasa que se administrará en el área diana será de 25 unidades ABC. Cuando solo se realizará una única inyección y la dosis seleccionada sea de 5 unidades ABC, la dosis total de colagenasa administrada será de 5 unidades ABC. La concentración de la colagenasa administrada en el área afectada por la colagenasa está entre aproximadamente 50 unidades ABC/ml y aproximadamente 2000 unidades ABC/ml. La colagenasa se puede administrar en un volumen por inyección de aproximadamente 0.5 ml o menos. En otro aspecto, la colagenasa se puede administrar en un volumen por inyección de aproximadamente 0.1 ml a aproximadamente 0.5 ml. El volumen total de colagenasa inyectada puede, por ejemplo, estar entre aproximadamente 0.1 ml (cuando solo se utiliza un solo sitio de inyección) y aproximadamente 7 ml (para múltiples sitios de inyección), y mayor para áreas de tratamiento de mayor tamaño. En una realización en la que el área de tratamiento es de aproximadamente 80 cm², el volumen total inyectado es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 ml, sumado de 10 inyecciones de entre 0.1 ml y 0.5 ml.

La colagenasa es una enzima que tiene la capacidad específica para digerir el colágeno. Una fuente comercial de colagenasa es de la fermentación de *Clostridium histolyticum*. En ciertos aspectos, la colagenasa comprende una combinación de colagenasa I y colagenasa II purificadas de *Clostridium histolyticum*. La colagenasa I y la colagenasa

5 II están presentes en la composición farmacéutica para uso en la invención en una proporción de masa de 1 a 1. La
 10 colagenasa AUX I tiene una cadena polipeptídica única que consta de aproximadamente 1000 aminoácidos con un
 peso molecular de 115 kDa. La colagenasa AUX II también tiene una única cadena polipeptídica que consta de
 15 aproximadamente 1000 aminoácidos con un peso molecular de 110 kDa. La colagenasa cruda obtenida de *C.*
histolyticum se puede purificar mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, que
 incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad con heparina, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con
 hidroxapatita, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de
 quelación de metales. Los métodos de purificación de la colagenasa cruda obtenida de *C. histolyticum* también se
 describen en las patentes de EE. UU. No. 7,811,560. Como se discutió anteriormente, una formulación inyectable que
 comprende colagenasa I y colagenasa II de *C. histolyticum* se vende en los EE. UU. con el nombre comercial
 XIAFLEX® y está aprobada por la FDA de los EE. UU. Para el tratamiento de la contractura de Dupuytren. La
 colagenasa puede ser, por ejemplo, ser un producto liofilizado parenteral compuesto por dos colagenasas en una
 relación de masa aproximada 1:1, colagenasa I (AUX-I, colagenasa clostridial tipo I) y colagenasa II (AUX-II;
 colagenasa clostridial tipo II). Preferiblemente, la colagenasa comprende a la colagenasa I y a la colagenasa II que
 tienen una relación de masa de aproximadamente 1 a 1 y que tienen una pureza de al menos aproximadamente el
 95% por área, según se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (como se describe,
 por ejemplo, en la Patente de EE. UU. No. 7,811,560).

20 Las composiciones de colagenasa de la invención también pueden prepararse mezclando un número específico de
 unidades de actividad o masas específicas de las enzimas purificadas. La actividad de la colagenasa se puede medir
 por la capacidad de la enzima para hidrolizar el péptido sintético o el sustrato de colágeno. Los expertos en la materia
 podrán reconocer que los ensayos enzimáticos distintos de los descritos en la presente también pueden utilizarse para
 definir y preparar composiciones enzimáticas funcionalmente equivalentes.

25 Se entiende que los términos "colagenasa I", "ABC I", "AUX I", "colagenasa AUX I" y "colagenasa ABC I" significan lo
 mismo y pueden utilizarse indistintamente. De manera similar, los términos "colagenasa II", "ABC II", "AUX II",
 "colagenasa AUX II" y "colagenasa ABC II" se refieren a la misma enzima y también se pueden utilizar de forma
 intercambiable.

30 En ciertas realizaciones adicionales, la colagenasa administrada de acuerdo con un método descrito en la presente
 es una colagenasa recombinante.

35 La colagenasa se administra en una composición farmacéutica que comprende a la colagenasa I y a la colagenasa II
 en una relación de masa 1:1 con una actividad específica de 10,000 unidades ABC por 0.58 mg de colagenasa y un
 vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición no incluye a una enzima proteasa
 distinta de la colagenasa (distinta de una pequeña cantidad o rastro de una enzima proteolítica que puede estar
 presente en la colagenasa purificada a partir de una fermentación bacteriana). En realizaciones adicionales, la
 composición farmacéutica no incluye a una enzima distinta de la colagenasa (distinta de una pequeña o pequeña
 40 cantidad de enzima que puede estar presente en la colagenasa purificada a partir de una fermentación bacteriana).
 Un experto en la técnica entenderá que una colagenasa derivada de una fermentación bacteriana, incluso después
 de la purificación, puede contener cantidades pequeñas o rastros de impurezas, incluidas otras enzimas, como otras
 enzimas proteasas. El rastro o la pequeña cantidad de impureza puede ser, por ejemplo, inferior a aproximadamente
 el 5%, inferior a aproximadamente el 4%, inferior a aproximadamente el 3%, inferior a aproximadamente el 2% o
 inferior a aproximadamente el 1% de la composición de colagenasa. En algunas realizaciones, la cantidad pequeña o
 45 rastro de impureza puede ser menor que aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% por área, según lo determinado
 por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. En otro aspecto, la composición farmacéutica consiste
 esencialmente en colagenasa y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente,
 una composición farmacéutica "que consiste esencialmente en colagenasa y un vehículo o diluyente
 farmacéuticamente aceptable" pretende excluir de las composiciones farmacéuticas a otras enzimas proteasas y
 50 hialuronidasas distintas de las pequeñas o rastros como se describió anteriormente. En ciertos aspectos adicionales,
 una composición que "consiste esencialmente en colagenasa" excluye de las composiciones a enzimas distintas de
 la colagenasa. En una realización adicional, la composición farmacéutica consiste en colagenasa y una sal
 farmacéuticamente aceptable de la misma.

55 El método para tratar o reducir a la PFE puede incluir además a el tratamiento previo del área diana con un agente
 anestésico local.

60 En la presente se describe el tratamiento o la reducción de PFE en un paciente, este consiste esencialmente en
 administrar una o varias inyecciones de colagenasa a un área afectada por PFE en la que la dosis de colagenasa
 administrada está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 unidades ABC y, opcionalmente, además, en
 donde la concentración de colagenasa es de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 unidades ABC/ml. En la
 presente también se describe el tratamiento o la reducción de PFE en un paciente, este consiste en administrar una
 pluralidad de inyecciones de colagenasa en las que la dosis de colagenasa administrada por inyección es de
 aproximadamente 5 a aproximadamente 200 unidades ABC y, opcionalmente, en donde la concentración de
 65 colagenasa es de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 unidades ABC/ml.

El portador farmacéuticamente aceptable puede ser uno o más portadores líquidos o excipientes apropiados para la inyección. Tal y como se utiliza en la presente, el término "portador o excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un material encapsulante o una formulación auxiliar de cualquier tipo, debe ser no tóxico, inerte, y diluyente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; glicoles tales como propileno glicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes reguladores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; La solución de Ringer; alcohol etílico y las soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como el lauril sulfato de sodio y el estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes perfumantes, conservadores y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el juicio del formulador. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con las técnicas conocidas utilizando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1, 3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un solvente o un medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se utilizan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de utilizar. Las soluciones estériles también se pueden liofilizar para su uso posterior. En una realización, la composición farmacéutica que comprende colagenasa es una composición inyectable liofilizada formulada con lactosa. En una realización, cada miligramo de colagenasa inyectable se formula con 1.9 mg de lactosa. En otra realización, cada miligramo de colagenasa de inyección tiene preferiblemente aproximadamente 2800 unidades SRC y 51000 unidades medidas con un ensayo de potencia utilizando un sustrato sintético, pZGPGGPA.

En otra realización, la composición de colagenasa utilizada según un método de la invención es una composición inyectable liofilizada formulada con sacarosa, Tris a un nivel de pH de aproximadamente 8.0. Por ejemplo, 1.0 mg de la sustancia farmacológica de la invención se formula en 60 mM de sacarosa, Tris 10 mM, a un pH de aproximadamente 8.0 (esto equivale a 20.5 mg/ml de sacarosa y 1.21 mg/ml de Tris en el tampón de formulación). Generalmente, se incluye una fuente de calcio en la formulación, como el cloruro de calcio.

La invención se entenderá mejor en relación con los siguientes ejemplos, los cuales están destinados únicamente a modo de ilustración y no para limitar el alcance de la invención. Diversos cambios y modificaciones a las realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica y tales cambios y modificaciones pueden realizarse sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Eficacia de la colagenasa de *Clostridium histolyticum* en la lisis del colágeno dérmico en cerdos miniatura de Gottingen

La colagenasa de *Clostridium histolyticum* (Auxilium Product Operation, Malvern, PA) es un producto liofilizado parenteral compuesto por dos colagenasas en una relación de masa aproximada de 1:1, la colagenasa I (AUX-I, coltrerasa de tipo Clostridial I) y la colagenasa II (AUX-II; colagenasa clostridial tipo II). Estas colagenasas se aíslan y purifican a partir de la fermentación de *Clostridium histolyticum*. El vehículo para la reconstitución del producto liofilizado fue solución salina (cloruro de sodio al 0.9%) con cloruro de calcio al 0.003% (2 mM). El vehículo para la dilución y la preparación de las formulaciones descritas con más detalle a continuación fue solución salina (cloruro de sodio al 0.9% para inyección; Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL) con TRIZMA® 10 mM (0.13%) (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO), sacarosa 60 mM (2.0%) (Sigma Aldrich, Inc., St. Louis, MO) y cloruro de calcio 2 mM (pH 8.0) (Aldrich Chemical Corporation, Allentown, PA). Se utilizó HCl 1N (ácido clorhídrico) para llevar el pH del vehículo para dilución a 8.0. El vehículo para la dilución se mezcló a lo largo de los procedimientos de preparación, toma de muestras y administración de la dosis. El vehículo para la dilución se filtró luego de forma estéril utilizando un filtro de jeringa PVDF de 0.22 mm en un vial estéril y se cubrió con un septo. El vehículo para la dilución se preparó utilizando una técnica aséptica dentro de una campana de flujo laminar utilizando utensilios de vidrio y esterilizados.

Las formulaciones de dosificación se prepararon en las concentraciones del artículo de prueba (colagenasa de *Clostridium Histolyticum*) indicadas en la siguiente tabla:

Tabla 1

Número de tratamiento	Concentración del artículo a prueba ^a (mg/ml) / (unidades ABC/ml)	pH ^b
1	0.0015/25.9	8
2	0.003/51.2	8
3	0.005/86.2	8
4	0.009/55.2	8
5-7	0.015/258.6	8
8-9	0.03/517.2	8
10	0.07/1206.9	8
11	0.09/1551.7	8
12	0.15/2586.2	8

^a = La formulación del artículo a prueba no es ajustaron para la pureza

^b = medición de pH utilizando papel litmus

5 Las formulaciones de dosificación se prepararon el día de la dosificación. El producto liofilizado se reconstituyó utilizando el vehículo para la reconstitución para obtener una solución de artículo a prueba de reserva de 2.5 mg/ml. El vehículo para la dilución se utilizó para diluir la solución del artículo de prueba de reserva y preparar las formulaciones que se utilizarán para la dosificación. Las formulaciones se mantuvieron en hielo húmedo antes y durante la dosificación. Las formulaciones se prepararon utilizando una técnica aséptica dentro de una campana de flujo laminar utilizando utensilios de vidrio y esterilizados.

10 Se utilizaron cerdos miniatura de Göttingen como sistema de prueba en este estudio. Esta especie y raza de animales se considera apropiada para los estudios de toxicidad general y se han utilizado como modelo de investigación biomédica en una amplia variedad de disciplinas. Los cerdos muestran muchas similitudes con el hombre en anatomía y fisiología cardiovascular, fisiología digestiva y estructura y función tegumentarias. Debido a la similitud de la anatomía y fisiología de la piel entre el cerdo y el hombre, los cerdos se han convertido en modelos estándar para estudios de cirugía plástica, cicatrización de heridas y toxicidad dérmica (Svendson et al, (1998), Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 1998, 25 (suplemento 1): 27-30). Históricamente, los cerdos se han utilizado en la evaluación toxicológica de posibles terapias.

20 Las cerdos miniatura de Göttingen (4 machos y 3 hembras) se recibieron con buena salud de Marshall BioResources, North Rose, NY. Los animales tenían aproximadamente 3 a 4 meses de edad al momento de la recepción. Cada animal recibió una dosis de los 12 tratamientos, para una dosis total por animal de aproximadamente 0.43 mg de colagenasa de *Clostridium histolyticum*. Los animales tenían aproximadamente 4 meses de edad a la administración de la dosis. Los pesos corporales oscilaron entre 7185 g a 8646 g para los machos y 9333 g a 9633 g para las hembras en la dosificación. Las formulaciones del artículo de prueba se administraron a animales anestesiados con telazol/xilazina en el día de estudio 0 mediante inyección subcutánea (bolo). El día previo a la inyección, las áreas designadas para la inyección se recortaron si era necesario. Se administraron seis inyecciones a lo largo del tronco lateral derecho e izquierdo de cada animal con una jeringa y una aguja del tamaño adecuado (calibre 16-23). Los animales no fueron dosificados en el mismo sitio más de una vez. Cada inyección subcutánea consistió en un tratamiento diferente, asignado aleatoriamente (combinación de concentración de formulación y volumen de dosis). Los sitios de inyección se espaciaron lo suficiente como para evitar posibles reacciones de los sitios de inyección adyacentes. El área que rodea el sitio de la deposición del artículo de prueba se marcó con un marcador permanente y se anotó según fue necesario. Se etiquetaron los sitios de inyección individuales. La vía de administración seleccionada para este estudio fue la inyección subcutánea.

35 No se detectaron efectos histológicos relacionados con el fármaco en adipocitos, nervios, estructuras anexas (folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas) o la epidermis suprayacente. No hubo diferencias constantes en la lisis del colágeno entre los sexos o entre los animales sacrificados a las 24 o 48 horas posteriores a la dosis en la extensión estimada de la lisis del colágeno, los resultados se combinan por género para las necropsias posteriores a la dosis de 24 y 48 horas en la tabla que se muestra a continuación. En concentraciones inferiores a 0.015 mg/ml, la extensión de la lisis del colágeno fue generalmente sensible a la dosis. A ≥ 0.015 mg/ml, la extensión de la lisis del colágeno fue generalmente proporcional al volumen de la dosis inyectada en oposición a la dosis total o la concentración de la formulación (por ejemplo, los artículos de prueba 7 y 8 representan la misma dosis administrada a una concentración más baja y un volumen más alto para el artículo de prueba 7).

45

Tabla 2

Artículo de prueba	Concentración (mg/ml)/ (unidades ABC/ml)	Volumen de dosis (ml)	Dosis total (mg/unidades ABC)	Extensión media de la lisis del colágeno (cm ²) ^a		
				Machos	Hembras	Ambos
1	0.0015/25.9	0.2	0.0003/5.17	0.38	2.90	1.64
2	0.003/51.2	0.2	0.0006/10.3	2.15	1.77	1.96
3	0.005/86.2	0.2	0.001/17.2	1.81	1.84	1.82
4	0.009/155.2	0.2	0.0018/31.0	3.13	2.27	2.70
5	0.015/258.6	0.05	0.00075/12.9	1.89	3.04	2.47
6	0.015/258.6	0.1	0.0015/25.9	4.15	2.82	3.48
7	0.015/258.6	0.2	0.003/51.2	5.84	3.89	4.87
8	0.3/517.2	0.1	0.003/51.2	3.93	3.57	3.75
9	0.3/517.2	0.2	0.006/103.4	6.05	4.08	5.07
10	0.07/1206.9	0.1	0.007/120.7	6.37	4.78	5.57
11	0.09/1551.7	0.1	0.009/155.2	5.50	4.60	5.05
12	0.15/2586.2	0.1	0.015/258.6	5.72	4.43	5.07

a = Para cada género, la extensión media de la lisis del colágeno se combinó para los tres animales en los intervalos de necropsia de 24 y 48 horas.

5 La colagenasa de *Clostridium Histolyticum* administrada como inyecciones subcutáneas únicas en concentraciones que oscilan entre 0.0015 y 0.15 mg/ml resultó en una inflamación local en los sitios tratados con Colagenasa de *Clostridium Histolyticum* en concentraciones ≥ 0.015 mg/ml y la lisis de colágeno (el efecto farmacológico esperado de la colagenasa *Clostridium Histolyticum*) en todas las dosis, volúmenes de dosis y concentraciones de formulación en este estudio. La dosis mínimamente efectiva en este estudio fue de 0.0003 mg de proteína y la concentración mínimamente efectiva fue de 0.0015 mg/ml. En concentraciones inferiores a 0.015 mg/ml, generalmente fue evidente una respuesta dependiente a la dosis para el grado de lisis del colágeno. A concentraciones ≥ 0.015 mg/ml, el grado de lisis efectiva del colágeno reflejó el volumen de dosis dado más que la dosis total o la concentración de la formulación.

15 La lisis del colágeno fue acompañada consistentemente por una serie de cambios secundarios. Estos cambios incluyeron lo siguiente: hemorragia y/o inflamación aguda observada consistentemente en todos los niveles de dosis efectivos; necrosis de las fibras musculares de panniculus carnosus a ≥ 0.003 mg/m (dosis totales ≥ 0.0006 mg de proteína); edema perivascular e intramural, neovascularización/fibrosis, necrosis vascular y/o trombosis observadas esporádicamente a concentraciones ≥ 0.009 mg/m (dosis totales ≥ 0.0018 mg de proteína); y hemorragia intramural arterial observada esporádicamente a concentraciones de formulación ≥ 0.030 mg/ml (dosis totales ≥ 0.003 mg de proteína). No hubo efectos mediados por la colagenasa de *Clostridium histolyticum* sobre los adipocitos, los nervios, las estructuras anexiales o la epidermis suprayacente.

25 Los resultados de este estudio mostraron cierto grado de lisis de colágeno histológicamente detectable de los septos dérmicos en todas las concentraciones de dosis de Colagenasa de *Clostridium Histolyticum*; sin embargo, se observaron más áreas de lisis completa de los septos dérmicos en concentraciones ≥ 0.015 mg/ml. En este estudio, no hubo efectos mediados por la colagenasa de *Clostridium histolyticum* sobre los adipocitos, los nervios, las estructuras anexales de la piel o la epidermis suprayacente. Se observaron efectos locales de la colagenasa de *Clostridium Histolyticum* (hemorragia y/o inflamación aguda) en cada concentración en el examen general y/o microscópico en la necropsia. No hubo diferencias constantes en la lisis del colágeno entre los sexos o entre los animales sacrificados a las 24 o 48 horas posteriores a la administración de la dosis en la extensión estimada de la lisis del colágeno.

35 En concentraciones efectivas en la lisis completa de los septos dérmicos, se observó que la lisis de colágeno dependiente del volumen y de la dosis se produjo dentro de un diámetro de aproximadamente 2.5 cm en el estudio de los cerdos miniatura.

Ejemplo 2. Estudio de fase 1b, etiqueta abierta, dosis escalada, y farmacocinética para el tratamiento de PFE

Los objetivos de este estudio son evaluar la seguridad, la efectividad, la farmacocinética y la inmunogenicidad de la Colagenasa de *Clostridium Histolyticum* a dosis totales crecientes en un área de 80 cm², con un intervalo de 0.0029 mg a 0.116 mg (50 a 2000 unidades ABC) y un aumento concentraciones en el rango de 0,0029 mg/ml a 0,116 mg/ml (50 a 2000 unidades ABC por ml) en el tratamiento de mujeres adultas con PFE.

5 Con base en los hallazgos discutidos anteriormente en el estudio de cerdos miniatura (Ejemplo 1), la plantilla de inyección para el estudio clínico de Fase 1 está diseñada para permitir una distancia de aproximadamente 2.5 cm entre las inyecciones. Se espera que esta distancia permita una distribución y actividad adecuadas de colagenasa de *Clostridium Histolyticum* dentro del área de 8 cm x 10 cm de PFE sin brechas significativas o superposición dentro del
10 área de tratamiento. En un intento por determinar la dosis óptima para el tratamiento de PFE (por ejemplo, eficaz con efectos adversos locales mínimos), se realizó una selección de dosis luego de considerar el perfil de seguridad favorable de la colagenasa de *Clostridium histolyticum* hasta la fecha, tanto en el desarrollo clínico como en la práctica clínica, así como en los datos del estudio con cerdos miniatura. Como resultado, se propone una dosis inicial de 0.0029 mg inyectados como 10 dosis separadas de 0.00029 mg dentro del área de PFE objetivo de 8 cm x 10 cm a una
15 concentración de 0.0029 mg/ml para la Fase 1 del estudio.

Este estudio es un estudio de Fase 1b, de etiqueta abierta, de dosis escalada y de farmacocinética. Durante la visita de selección, mientras el sujeto está de pie, el investigador o la persona designada calificada examinarán el glúteo izquierdo y derecho y el muslo izquierdo y derecho, y seleccionarán un cuadrante que tenga una puntuación de escala de severidad de PFE (CSS) fotonumérica de ≥ 10 que represente una Gravedad severa de PFE (Hexsel et al., 2009). El investigador o persona designada calificada identificará un área de PFE dentro del cuadrante seleccionado que tiene al menos 8 cm x 10 cm (es decir, el área diana de PFE) y que es adecuada para el tratamiento (es decir, que se encuentra en la parte superior lateral del muslo o dentro del glúteo y no involucra el pliegue glúteo). El área diana de PFE debe ser evidente cuando el sujeto está de pie, sin el uso de ninguna manipulación como pellizcar la piel o realizar
20 contracción muscular. Cada sujeto será evaluado para determinar la elegibilidad del estudio dentro de los 21 días antes de la inyección del fármaco del estudio en el Día 1.

En este estudio, 63 sujetos recibirán 10 inyecciones simultáneas de volumen igual de colagenasa de *Clostridium Histolyticum* dentro del área diana de PFE. Tras la selección y la determinación de la elegibilidad del estudio, los sujetos se asignarán secuencialmente a las Cohortes 1, 2, 3 y 4 (Tabla 3). Los primeros nueve sujetos se asignarán a la cohorte 1 (1 ml de volumen total/área diana de PFE). Dentro de cada una de las siguientes cohortes 2 a 4, los primeros nueve sujetos de cada cohorte se asignarán al área de PFE de volumen total/diana de 5 ml, seguidos de los siguientes nueve sujetos que se asignarán al área de 1 ml de volumen total/área diana de PFE. La dosificación comenzará con la cohorte 1. La dosificación en las cohortes 2 y 3 no comenzará hasta que la seguridad de los sujetos en la cohorte 1 haya sido evaluada por el comité de monitoreo de seguridad (SMC). La dosificación en la cohorte 4 no comenzará hasta que el SMC haya evaluado la seguridad de los sujetos en las cohortes 2 y 3.

Las dosis propuestas para tratar un área de 8 cm x 10 cm de PFE representan entre el 0.5% (0,0029 mg) y el 20% (0.116 mg) de la dosis utilizada en una única inyección para la contractura de Dupuytren a una concentración que está entre 0.1 % (0.0029 mg/ml) y 5% (0.116 mg/ml) de la concentración utilizada en el producto aprobado para la contractura de Dupuytren.

Tabla 3: Estudio de asignación de fármacos por cohorte

Cohorte	Dosis CCH/Área diana ^a de PFE	Volumen/Área diana ^a de PFE	Concentración	Dosis PFE/ Área diana de PFE como porcentaje a la dosis aprobada de Dupuytren (0.58 mg)	Concentración de PFE como porcentaje a la concentración aprobada de Dupuytren (2.3 mg/ml)
1	0.0029 mg (50 U) ^b	1 ml	0.0029 mg/ml (50 U/ml)	0.5%	0.1%
2a	0.0145 mg (250 U)	5ml	0.0029 mg/ml (50 U/ml)	2.5%	0.1%
2b	0.0145 mg (250 U)	1 ml	0.0145 mg/ml (250 U/ml)	2.5%	0.6%
3a	0.0435 mg (750 U)	5 ml	0.0087 mg/ml (150 U/ml)	7.5%	0.4%
3b	0.0435 mg (750 U)	1 ml	0.0435 mg/ml (750 U/ml)	7.5%	1.9%
4a	0.116 mg (2000 U)	5 ml	0.0232 mg/ml (400 U/ml)	20%	1%
4b	0.116 mg (2000 U)	1 ml	0.116 mg/ml (2000 U/ml)	20%	5%

^a Un total de 10 inyecciones individuales en los sitios de inyección en el área diana de PFE de 8 cm x 10 cm. CCH es colagenasa *Clostridium histolyticum*

^b U es unidades ABC

Los componentes de la colagenasa de *Clostridium Histolyticum* son: colagenasa mixta AUX-I y AUX-II, tris 10 mM, sacarosa 60 mM. Los componentes del Diluyente A estéril de la colagenasa de *Clostridium Histolyticum* para la reconstitución son: 0.03% (2 mM) de cloruro de calcio (CaCL) en solución de cloruro de sodio al 0.9% (154 mM) (NaCL), pH 6.0-7.0, se suministra como un líquido esterilizado terminalmente a 3.0 ml por vial. Los componentes del Diluyente B estéril tamponado con colagenasa de *Clostridium Histolyticum* para dilución adicional son: 0.03% (2 mM) de cloruro de calcio y 0.12% (10 mM) de trometamina (TRIS) al 0.9% (154 mM) de cloruro de sodio, se suministra cloruro a pH 8.0 como un líquido esterilizado terminalmente a 3.0 ml por vial. Después de la reconstitución con el diluyente A y la dilución adicional con el diluyente B, la solución de A4500 se puede mantener a temperatura ambiente (20° a 25°C/68° a 77°F) hasta una hora o refrigerada a 2° a 8°C (36° a 46°F) hasta por 4 horas antes de la administración.

Una plantilla de inyección estará hecha de un material claro y delgado. La plantilla de inyección de 8 cm x 10 cm se estampará previamente con el diagrama y los sitios de inyección que se muestran en la Figura 1. Cada uno de los puntos negros dentro del octágono representa un sitio de inyección. La 'X' rodeada representa el sitio de inyección del hoyuelo central (es decir, el área de la depresión más profunda en el área diana (Figura. 1). Cada punto negro (incluido el sitio del hoyuelo central y las cuatro esquinas) se cortará para permitir al investigador marcar el área diana de PFE según sea necesario. Cada punto dentro del octágono que se muestra en la Figura 1 representa un sitio de inyección. La X dentro del círculo representa el sitio de inyección en el "hoyuelo central". Las cuatro esquinas están etiquetadas como superior derecho (SD), inferior derecho (ID), superior izquierdo (SI) e inferior izquierdo (II).

Durante la visita de selección, mientras el sujeto está de pie, el investigador o la persona designada calificada examinarán el glúteo izquierdo y derecho y el muslo superior posterior izquierdo y derecho y seleccionarán un cuadrante que tenga PFE de moderada a grave (puntuación CSS de ≥ 10). El investigador o persona designada calificada identificará un área de PFE dentro del cuadrante seleccionado que tiene al menos 8 cm x 10 cm (referido en este ejemplo como el área diana de PFE) y es adecuado para el tratamiento (por ejemplo, está dentro del muslo superior posterior) o dentro del glúteo y no involucra el pliegue del glúteo). El área diana de PFE también debe ser evidente cuando el sujeto está de pie, sin el uso de ninguna manipulación (como pellizcar la piel o realizar contracción muscular).

El investigador colocará la plantilla de inyección sobre el área diana de PFE (mientras el sujeto permanece de pie) y colocará la plantilla rodeada con una 'X' sobre el centro de la depresión más profunda (por ejemplo, el hoyuelo central) en el área diana. El investigador utilizará un marcador quirúrgico y marcará la piel del sujeto en dos esquinas de la plantilla. El investigador eliminará la plantilla y registrará qué dos esquinas de la plantilla fueron marcadas (por ejemplo, superior derecha, inferior derecha, superior izquierda, inferior izquierda). El investigador utilizará una cinta métrica para medir de la siguiente manera:

1. Identificar la línea media de la parte superior del muslo y del glúteo a partir del centro de la fosa poplítea (Figura. 2).
2. Identificar la línea que está perpendicular a la línea media y pasa por la primera marca de la esquina de la plantilla (como se muestra en la Figura. 2, [Línea BC]). Medir la distancia entre los puntos B y C (distancia de registro).
3. Medir la distancia desde el punto A al punto B como se muestra en la Figura. 2 (registro de distancia).
4. Repetir los pasos 2 y 3 para medir la segunda marca de la esquina de la plantilla (Figura. 2, [Puntos A, D y E]).

Cada medición registrada se utilizará posteriormente para reubicar el área diana de PFE de 8 cm x 10 cm antes de la inyección y antes de cada punto de tiempo de evaluación de la eficacia.

En el día 1, después de que se haya identificado, marcado (como se describió anteriormente), fotografiado el lugar de inyección, y se hayan completado las evaluaciones de eficacia previas a la inyección, el sujeto se colocará boca abajo en la mesa de examen para que el área diana de PFE de 8 cm x 10 cm con los sitios de inyección marcados previamente sean visibles y evaluables para el investigador. El área del sitio de la inyección debe estar preparada con un antiséptico adecuado, como el alcohol.

Utilizando una jeringa de 5 ml o 1 ml preparada previamente (según la asignación de la cohorte) con una aguja de calibre 30 de $\frac{1}{4}$ de pulgada, el investigador administrará una dosis de 0.5 ml o 0.1 ml de la colagenasa de *Clostridium Histolyticum* en cada uno de los 10 sitios de inyección. En cada uno de los 10 sitios, el medicamento del estudio se inyectará perpendicular a la piel del sujeto hasta una profundidad de $\frac{1}{4}$ de pulgada (~7 mm).

El investigador administrará el fármaco del estudio en una secuencia que asegure que cada uno de los 10 sitios reciba una inyección única de 0.5 ml o 0.1 ml de la colagenasa de *Clostridium histolyticum*. Después de la décima inyección, se habrá administrado el volumen máximo permisible del fármaco del estudio (5 ml o 1 ml). Se anotará cualquier inyección en la superficie de un sitio de inyección después de la inyección (que sugiera extravasación) y se registrará

ES 2 741 476 T3

la ubicación de la inyección asociada. No se realizará ningún masaje o palpación local después de la inyección del fármaco de estudio.

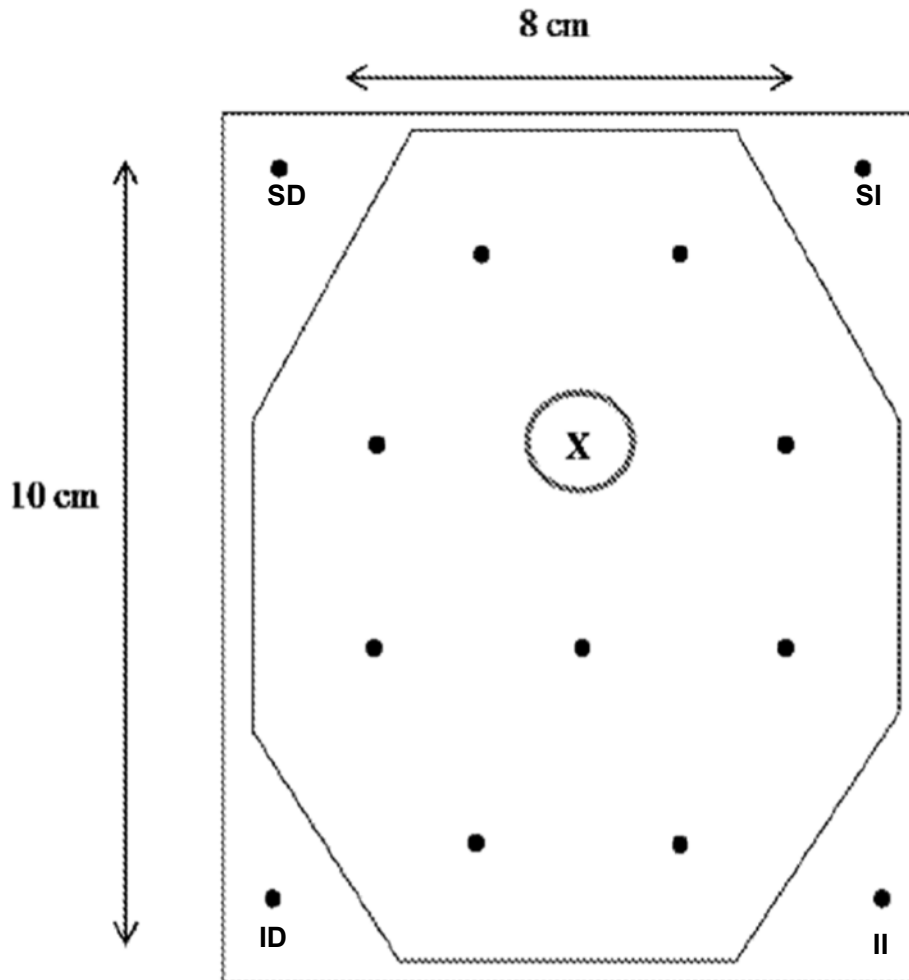
Los siguientes puntos finales primarios se evaluarán en el día 90:

- 5 • Evaluación de la escala de mejora estética global del investigador en el área diana de PFE;
- Evaluación de la escala de mejora estética global del sujeto en el área diana de PFE; y
- 10 • Un análisis de respuesta basado en la proporción de sujetos con una mejora de $\geq 30\%$ con respecto a la línea basal en la desviación estándar del contorno de la superficie del área diana de PFE basada en fotografía digital 3D.

15 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la materia entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

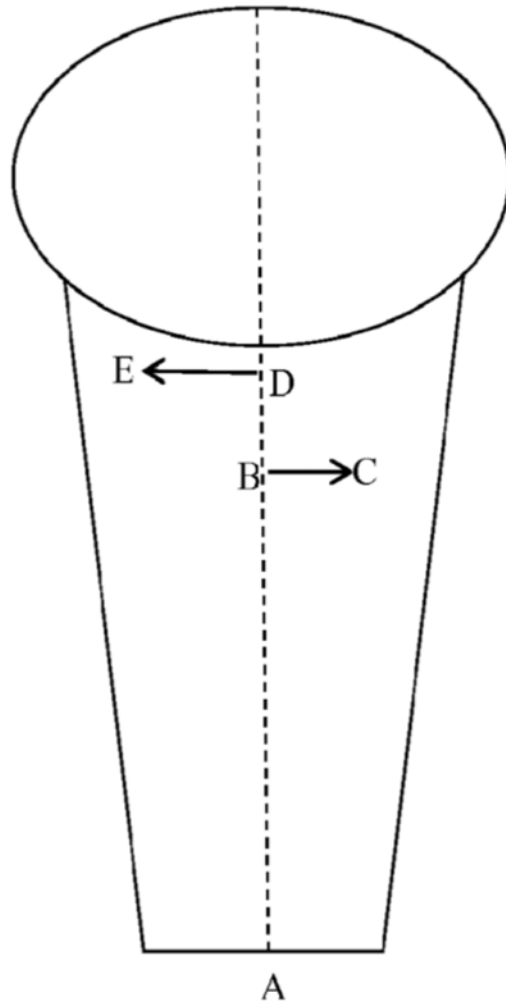
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método cosmético para tratar o reducir la paniculopatía fibrosclerótica edematosa (PFE) en un paciente que comprende los pasos de: proporcionar una composición farmacéutica que comprende a un portador farmacéuticamente aceptable, colagenasa I y colagenasa II en una relación de masa 1:1 con una actividad específica de 10,000 unidades ABC por 0.58 mg de colagenasa, y administración por inyección subdérmica a dicho paciente con 5-200 unidades ABC por inyección de la composición farmacéutica en un área afectada por PFE, en donde cuando se administran múltiples inyecciones, los sitios de inyección son de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 cm unos de otros.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que se administra una pluralidad de inyecciones subdérmicas en una pluralidad de sitios de inyección.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que la concentración de colagenasa administrada está entre 50 y 2000 unidades ABC por mililitro.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada inyección de colagenasa se administra en un volumen de aproximadamente 0.5 ml o menos.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la dosis total de colagenasa administrada está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 2000 unidades ABC.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la dosis de colagenasa por inyección está entre 5 y 100 unidades ABC, preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 unidades ABC.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la colagenasa se purifica a partir de *Clostridium histolyticum*.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la colagenasa es una colagenasa recombinante.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos dos inyecciones, preferiblemente al menos cinco inyecciones, más preferiblemente al menos diez inyecciones de colagenasa se administran a dos, cinco o diez sitios de inyección, respectivamente, dentro del área afectada .
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el área afectada de PFE tiene un área de 1 cm² a 200 cm².
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se administra una pluralidad de inyecciones subdérmicas de colagenasa y en donde la distancia entre los sitios de inyección es de 2 a 3 cm.
- 45 12. El método de la reivindicación 9, en el que el área afectada por PFE tiene una longitud de aproximadamente 10 cm y una anchura de aproximadamente 8 cm.
13. El método de la reivindicación 11, en el que hay una distancia de aproximadamente 2.5 cm entre los sitios de inyección.
- 50 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada inyección tiene un volumen de aproximadamente 0.1 ml.
15. El método de la reivindicación 5, en el que la dosis total de la colagenasa administrada al área afectada está entre 5 a 1000 unidades ABC.
- 55 16. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que cada inyección tiene un volumen de aproximadamente 0.2 ml o menos.



Cada punto dentro del octágono representa un sitio de inyección. La X dentro del círculo representa el sitio de inyección al "hoyuelo central". Las cuatro esquinas están etiquetadas como superior derecha (SD), inferior derecha (ID), superior izquierda (SI) e inferior izquierda (II)

Figura 1



A= Línea media de la parte superior posterior del muslo y los glúteos (desde el centro de la fosa poplítea)

C= esquina de la plantilla

E= esquina de la plantilla

Figura 2