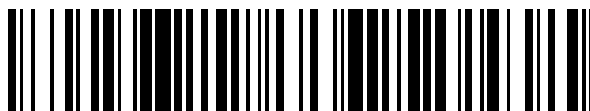


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 724**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2006** **PCT/IL2006/001492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2007** **WO07074454**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2006** **E 06821673 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 1965763**

54 Título: **Preparaciones enzimáticas estables y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

27.12.2005 US 753400 P

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

29.05.2020

73 Titular/es:

RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)

P.O. Box 39296

61392 TEL AVIV, IL

72 Inventor/es:

FREEMAN, AMIHAY y

HADAR, NOA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 763 724 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

Preparaciones enzimáticas estables y métodos de uso de las mismas

5 La presente divulgación se refiere a composiciones enzimáticas concentradas estables adecuadas para almacenamiento en condiciones ambientales, mientras se mantiene su actividad enzimática prevista. La divulgación se refiere, además, a kits que comprenden composiciones enzimáticas concentradas, métodos para preparar soluciones desbridantes a partir de dichas composiciones enzimáticas concentradas y métodos para usar las soluciones desbridantes diluidas.

10 Antecedentes de la invención

Los pacientes que sufren úlceras crónicas y particularmente úlceras diabéticas tienen un alto riesgo de infecciones locales y sistémicas. En los frecuentes acontecimientos de úlceras en las piernas y los pies, estos pacientes también corren el riesgo de deformidad estructural del pie, movilidad articular limitada y amputación. Los tratamientos para las úlceras infectadas incluyen control glucémico, antibióticos sistémicos y cuidado meticuloso de heridas, principalmente desbridamiento de tejido necrótico. El desbridamiento generalmente se intenta mediante métodos quirúrgicos, sin embargo, se han ideado métodos no quirúrgicos que incluyen el uso de enzimas desbridantes para evitar la pérdida de sangre y el dolor inherentes a la cirugía. Además, el desbridamiento enzimático no requiere la exposición del paciente lesionado a traumas adicionales relacionados con el procedimiento quirúrgico y, sin embargo, proporciona una resolución inmediata y rápida de las afecciones médicas de emergencia asociadas con las úlceras.

25 Las enzimas desbridantes también son útiles para tratar problemas cutáneos graves, tales como eccema, psoriasis y similares, y afecciones cutáneas menos graves, tales como arrugas, acné y piel seca, como se desvela, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N.º 4.524.136; 5.439.935; 5.441.740; 5.554.366; 5.853.705 y 6.780.444. También están disponibles productos comerciales que comprenden tales enzimas, por ejemplo, Accuzyme® (papaína) y Granulex® (tripsina), cuya aplicación es limitada para el desbridamiento de heridas.

30 Las patentes de Estados Unidos N.º 4.197.291; 4.226.854; 4.307.081; 4.329.430 y 5.830.739 desvelan enzimas hidrolíticas derivadas de la planta de piña y una composición que las comprende. La solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2003/0026794 desvela métodos para tratar afecciones cutáneas usando al menos una enzima que afecta a una o más capas particulares de piel. Las preparaciones enzimáticas mencionadas anteriormente tienen una vida útil limitada en condiciones de almacenamiento estándar, tales como almacenamiento a temperatura ambiente.

35 Las composiciones enzimáticas pueden estabilizarse mediante restos que inhiben la pérdida de actividad enzimática durante el almacenamiento. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.692.726 desvela composiciones orales estables que comprenden enzimas, cloruro de cetilpiridinio y un agente reductor que confiere estabilidad a las composiciones. Normalmente, dichos aditivos son adecuados solo para enzimas particulares y además para usos particulares de dichas enzimas.

40 Los métodos y aparatos para aplicar la composición enzimática sobre una herida se enseñan en los documentos WO03/011369, US 2004/0186421 y WO2005/070480 del inventor de la presente divulgación. Estas solicitudes desvelan aparatos para soluciones terapéuticas de flujo continuo, particularmente soluciones que comprenden proteasas como principio activo, sobre una herida tal como una úlcera.

45 El documento US 4715899 se refiere a lentes de contacto sucias de proteínas que se limpian convenientemente mediante el uso concurrente de una solución acuosa que contiene una sulfhidril proteasa inactivada y un agente tio reductor acuoso suave. La proteasa se inactiva alostéricamente por reacción con tetrationato de sodio.

50 El documento GB 913203 se refiere a una formulación enzimática para su uso en ablandar carne en una solución acuosa sustancialmente estéril de una enzima proteolítica, por ejemplo, papaína, bromelina, ficina, tripsina o pancreatina, que está libre de materia insoluble y ha sido tratada para eliminar las impurezas. La solución se puede preparar suspendiendo la enzima en agua, clarificando la solución resultante, ajustando el pH a más de 7,0 y esterilizándola eliminando por filtración las bacterias. La solución puede purificarse por fraccionamiento de sal o por fraccionamiento por un disolvente tal como etanol. La enzima puede estabilizarse, es decir, inactivarse de forma reversible, con peróxido de hidrógeno. La inactivación reversible implica la adición de material inactivador o la eliminación del material activador, los materiales activadores que normalmente se encuentran en la papaína en bruto son glutatión, cisteína y succinato de deshidrogenasa succínica. De acuerdo con el ejemplo I, el polvo de papaína comercial se humedece con glicerol y se agita con agua que contiene peróxido de hidrógeno, la solución se deja reposar, luego se trata con catalasa y tierra de diatomeas y se filtra a través de un embudo Buchner, y el filtrado se diluye, se trata con cloruro de sodio, se ajusta a pH 7,3, y se filtra a través de un filtro Leitz en frascos esterilizados, los frascos se mantienen refrigerados hasta su uso.

65 El documento US 3539451 se refiere a la producción de papaína y ficina inactivadas de forma reversible.

El documento US 6692726 se refiere a una composición para el cuidado bucal que tiene una higiene bucal mejorada

y propiedades antiplaca que comprende un vehículo oralmente aceptable que contiene una combinación de una enzima, cloruro de cetilpiridinio y un agente reductor.

El documento US 4307081 se refiere a una nueva mezcla de enzima proteolítica que contiene escarasa derivada de bromelina útil para la digestión, disección y separación de tejido desvitalizado no viable, especialmente tejido de escara de tejido viable en un órgano huésped.

El inventor de la presente divulgación demostró además que la aplicación de una corriente de enzima proteolítica activa durante algunas horas, a través y sobre el área de la herida proporciona un desbridamiento efectivo (Freeman et al., *Wound* 16: 201-205, junio de 2004). Se descubrió que un tratamiento similar con una solución tampón desprovista de enzimas era ineficaz. Además, el tratamiento con una composición estática (no fluida) de enzimas durante un periodo de tiempo similar no tuvo ningún efecto.

Existe una necesidad insatisfecha de composiciones enzimáticas que comprendan enzimas desbridantes y que tengan una larga vida útil mientras se mantiene una actividad desbridante efectiva. Ventajosamente, dichas composiciones deben ser fáciles de usar y, por lo tanto, pueden ser aplicadas por cualquier usuario y no necesariamente por un profesional sanitario.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende un concentrado no activo de una tiol-proteasa, siendo dicho concentrado un concentrado hipertónico y comprendiendo al menos 20 mg/ml de una forma inactiva de dicha tiol proteasa y comprendiendo además al menos un agente osmótico, en la que dicho al menos un agente osmótico comprende glicerol y cloruro de sodio, y en la que la concentración de glicerol es como máximo el 30 % v/v y la concentración de cloruro de sodio es al menos el 1 % p/v y como máximo 18 % p/v, y en la que dicho concentrado tiene un pH dentro del intervalo de pH 3-6, y es estable durante al menos 1 semana a temperatura ambiente o a una temperatura dentro del intervalo de 4-10 °C y dicha tiol-proteasa se reactiva por dilución para poseer actividad proteolítica dentro del intervalo de 5.000 a 50.000 unidades USP/mg.

Preferentemente, dicha tiol proteasa es papaína.

Preferentemente, la concentración de la tiol proteasa está dentro del intervalo de 25 a 45 mg/ml.

Preferentemente, dicho agente osmótico puede comprender además una sustancia seleccionada del grupo que consiste en manitol, dextrano, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.

Preferentemente, el concentrado no activo está desprovisto de material particulado.

Preferentemente, la composición comprende además un tampón, seleccionado entre el grupo que consiste en: tampón ácido N-(2-acetamido)-2-iminodiacético, tampón acetato, tampón succinato, tampón maleato, tampón citrato, tampón MES y combinaciones de los mismos, preferentemente solución de acetato.

La presente invención se refiere también a un kit para preparar una composición desbridante, comprendiendo el kit un primer componente que comprende la composición; un segundo componente que comprende una solución concentrada de al menos un agente reductor; y un tercer componente que es una solución tampón concentrada que comprende al menos un agente tamponante y al menos un agente quelante, en el que mezclar dichos primer, segundo y tercer componentes en al menos una solución diluyente proporciona una solución desbridante que tiene un pH fisiológico y en el que dicha tiol-proteasa en dicha solución desbridante posee actividad proteolítica dentro del intervalo de 5.000 a 50.000 unidades USP/mg.

Preferentemente, la tiol proteasa es papaína.

Preferentemente, el primer componente comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en: tampón acetato, tampón succinato, tampón maleato, tampón citrato, tampón MES y combinaciones de los mismos.

Preferentemente, el primer componente es estable en almacenamiento en una temperatura dentro del intervalo de 4-10 °C.

Preferentemente, el al menos un agente reductor es un compuesto de tiol seleccionado del grupo que consiste en: sulfuro, cistamina, glutatión, N-acetilcisteína, cisteína y clorhidrato de cisteína.

Preferentemente, el pH del segundo componente está dentro del intervalo de pH 1 a 4.

Preferentemente, el tercer componente comprende un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en: tampón tris hidroximetilaminoetano (Tris), tampón Hepes, tampón lisina, tampón glicina, tampón MOPS, tampón imidazol y tampón MES.

Preferentemente, el kit en el que después de mezclar los primer, segundo y tercer componentes y la al menos una solución diluyente, el agente tamponante mantiene un pH dentro del intervalo de pH fisiológico.

5 Preferentemente, el kit en el que la al menos una solución diluyente comprende una solución seleccionada del grupo que consiste en: solución salina, solución salina hiperosmolar y solución salina que comprende al menos un agente osmótico.

10 Preferentemente, el kit en el que el al menos un agente osmótico comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: cloruro de sodio, glicerol, manitol, dextrano, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.

Preferentemente, el kit en el que la solución salina hiperosmolar comprende al menos el 1 % p/v de cloruro de sodio.

15 Preferentemente, el kit en el que la relación de volumen entre cada componente del kit y el volumen de la solución desbridante es al menos 1:10.

La presente invención también se refiere al uso del kit, opcionalmente en combinación con un apósito, en la preparación de un medicamento para desbridar una lesión cutánea o una piel dañada.

20 Preferentemente, la tiol proteasa es papaína.

Preferentemente, la lesión es una úlcera crónica.

Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra secciones histológicas del modelo de herida porcina tratada con una corriente de solución de papaína preparada de acuerdo con el ejemplo 1 durante 6 horas (A) u 11 horas (B) con respecto al control (no tratado; C).

30 La figura 2 exhibe secciones histológicas del modelo de herida porcina tratada con una corriente de solución de papaína preparada de acuerdo con el ejemplo 2 durante 6 horas (A) u 11 horas (B).

La figura 3 presenta secciones histológicas del modelo de herida porcina tratada con una corriente de solución de papaína preparada de acuerdo con el ejemplo 3 durante 6 horas (A) u 11 horas (B).

35 La figura 4 muestra secciones histológicas del modelo de herida porcina tratada con una corriente de solución de papaína preparada de acuerdo con el ejemplo 5 durante 11 horas.

40 La figura 5 demuestra el impacto de diferentes soluciones desbridantes sobre la morfología y la apariencia del desbridamiento de heridas necróticas.

La figura 6 representa un sistema de bomba de infusión para infusión i.v. en roedores.

45 Las figuras 7A y 7B presentan la vida útil de soluciones de papaína.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

50 El término "papaína", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima de la familia de la papaína de las tiol proteasas derivadas de plantas, que es capaz de ejercer actividad desbridante *in vitro* e *in vivo*. La papaína es una sulfhidril proteasa derivada del látex de *Carica* papaya. La papaína pura nativa es parcialmente reactiva hasta que se activa mediante agentes reductores suaves tales como cisteína, en el grupo funcional SH libre de la misma. La papaína se proporciona comercialmente como una forma cristalina parcialmente purificada o papaína en bruto, siendo esta última una mezcla que comprende papaína, quimopapaína y lisozima. De acuerdo con los principios de la presente divulgación, el término papaína se refiere a papaína que tiene una actividad dentro del intervalo de 10.000 a 100.000 unidades estadounidenses por mg de proteína, en la que una unidad USP de actividad de papaína es aquella que libera un equivalente de 1 mg de tirosina de una solución de sustrato de caseína como se describe en la guía de referencia de la Farmacopea de los Estados Unidos.

60 Las expresiones "forma no activa" o "forma inactiva" se usan en el presente documento para describir una composición enzimática que no exhibe la actividad pretendida, principalmente hidrólisis o proteólisis. Específicamente, una forma no activa de papaína que realiza parcialmente o no realiza ninguna actividad hidrolítica o proteolítica sustancial, que puede almacenarse durante meses sin perder su actividad hidrolítica potencial.

65 El término "estable" se usa en el presente documento para describir composiciones enzimáticas no activas que

conservan la actividad enzimática deseada tras la activación, incluso después del almacenamiento en una forma inactiva. La actividad deseada de una composición enzimática no activa estable se restablece fácilmente, preferentemente por dilución en soluciones adecuadas, tales como soluciones que comprenden al menos un compuesto de tiol y al menos un tampón que es capaz de proporcionar un pH apropiado a la solución diluida.

El término "restablecida" como se usa en el presente documento se refiere a la restauración de todas las actividades enzimáticas bien conocidas de la papaína, particularmente las actividades proteolíticas, es decir, la descomposición estructural de las proteínas, *in vivo* e *in vitro*.

Los términos "hipertónica" e "hiperosmolar" se usan indistintamente en el presente documento para describir soluciones que tienen osmolaridad que es al menos ligeramente hipertónica, en concreto, soluciones que tienen una presión osmótica más alta que un fluido isotónico, tal como solución salina. Dichas soluciones incluyen solución salina hiperosmolar y solución salina que comprende al menos un agente osmótico capaz de modificar la osmolaridad de la solución, particularmente, capaz de aumentar la osmolaridad de una solución isotónica.

La expresión "temperatura ambiente" como se usa en el presente documento se refiere a una temperatura dentro del intervalo de 10 a 30 °C, preferentemente, dentro del intervalo de 10-25 °C.

La expresión "manera reversible", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un inhibidor, ya sea una entidad química, una entidad biológica o una condición ambiental (por ejemplo, pH) para inhibir la actividad de una enzima, particularmente una actividad de desbridamiento de una enzima hidrolítica, bajo cierta condición que al cancelar tales condiciones se anula el efecto de inhibición. Por ejemplo, la inhibición de la actividad de una metaloenzima por un agente quelante, tal como EDTA, puede revertirse mediante la adición de metales en exceso. En particular, la expresión "manera reversible" excluye los inhibidores que causan un daño permanente a la enzima y por lo tanto inhiben la actividad enzimática deseada de una manera no reversible, tales como el fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF).

El término "desbridamiento", como se usa en el presente documento, debe interpretarse en su sentido más general y se refiere a la eliminación de tejido desvitalizado de una herida o la eliminación de células muertas de la superficie de la piel, también conocida como exfoliación cosmética.

Modos preferidos para llevar a cabo la divulgación

Mientras que la presente divulgación emplea muchos principios conocidos de la técnica de las enzimas proteolíticas y el uso de las mismas para el desbridamiento de heridas entre otras modalidades terapéuticas, la presente divulgación varía respecto a la técnica conocida en varias áreas críticas. En primer lugar, la presente divulgación proporciona por primera vez componentes almacenables que pueden mantenerse durante semanas y meses antes de su uso previsto como composición desbridante, en condiciones ambientales, mientras se mantiene la actividad potencial de los componentes, particularmente, componentes enzimáticos. En segundo lugar, obtener la composición desbridante de los componentes almacenables es un procedimiento sencillo, que simplemente incluye la reconstitución en la solución o soluciones adecuadas, que puede ser llevado a cabo por cualquier persona capaz de realizar estas simples etapas y no necesariamente un profesional sanitario.

En la técnica se conocen numerosos métodos para estabilizar preparaciones enzimáticas con el fin de almacenamiento de manera que las enzimas no pierdan su actividad potencial durante el almacenamiento. Por ejemplo, para metaloenzimas, el almacenamiento en presencia de cierta cantidad de quelante o quelantes de metal, tales como EDTA, inhibe la actividad enzimática que puede restaurarse incubando la solución de enzima EDTA con el metal que se requiere para la actividad enzimática, normalmente se requieren concentraciones en exceso de tales iones de metal/metale. Las metaloenzimas pueden someterse a diálisis antes o, en lugar de, la incubación con el quelante de metales, de modo que el metal migra de las enzimas por ósmosis. En dichos casos, la restauración de la actividad también se logra incubando la solución enzimática dializada con el ion metálico que requería la restauración de la actividad enzimática.

Otros métodos para almacenar formas no activas de enzimas incluyen la inmovilización de enzimas en una esfera porosa y el almacenamiento en un tampón que contiene aproximadamente el 50 % de glicerol. Aunque cada uno de los métodos mencionados anteriormente puede ser potencialmente adecuado para el almacenamiento de enzimas de modo que la actividad pueda recuperarse después del almacenamiento, en la práctica, cada enzima particular requiere condiciones particulares de almacenamiento. Si las condiciones de almacenamiento son inadecuadas para la enzima o para las actividades enzimáticas ejercidas por la misma, probablemente permanecerá inactivada. Por lo tanto, la presente divulgación tiene como objetivo definir las condiciones particulares de almacenamiento de enzimas hidrolíticas, particularmente cisteína (tiol) proteasas tales como cisteína proteasas derivadas de plantas que incluyen papaína, bromelina y ficina, particularmente papaína, aunque posiblemente otras enzimas proteolíticas pueden usarse durante siempre que puedan almacenarse y restaurarse de acuerdo con los principios de la presente divulgación.

El kit de la divulgación incluye al menos tres componentes separados para mezclar en una composición desbridante:

un primer componente que comprende una composición enzimática que comprende una tiol proteasa en una forma no activa, en el que la concentración de la tiol proteasa en el primer componente es al menos 10 veces mayor que la concentración de la tiol proteasa en la composición desbridante;

un segundo componente que comprende al menos un agente reductor capaz de activar la tiol proteasa, en el que la concentración del al menos un agente reductor es al menos 10 veces mayor que la concentración de dicho al menos un agente reductor en la composición desbridante; y

un tercer componente que comprende una solución tampón concentrada en el que al diluirse con el primer y segundo componentes y al menos una solución diluyente es capaz de mantener el pH de la composición desbridante resultante a un pH dentro del intervalo de pH que sea adecuado para la actividad de la tiol proteasa, particularmente papaína,

en el que mezclar los tres componentes del kit con al menos una solución diluyente proporciona una composición desbridante que tiene un pH fisiológico y que tiene además una actividad proteolítica dentro del intervalo de 10.000 a 100.000 unidades USP/mg.

Como alternativa, el kit comprende al menos una solución diluyente en lugar del tercer componente, dicha al menos una solución diluyente comprende al menos un agente tamponante, al menos un agente quelante, en el que dicha al menos una solución diluyente es isotónica o hipertónica.

Preferentemente, el agente reductor del kit se almacena en un recipiente que consiste en vidrio o cuarzo y más preferentemente en una atmósfera de nitrógeno o al vacío.

De acuerdo con los principios de la presente divulgación, la tiol proteasa contenida dentro del kit de la divulgación tiene preferentemente una actividad de al menos 30.000 unidades USP por 1 mg. A dicha actividad, la concentración de la tiol proteasa en la solución concentrada y también en la solución final puede reducirse, permitiendo así disminuir el volumen de las soluciones concentradas del kit.

De acuerdo con un aspecto, la relación de volumen entre cada componente del kit y el volumen de la composición desbridante es al menos 1:10. De acuerdo con otro aspecto, dicha relación de volumen es al menos 1:20. La solución final puede ser de aproximadamente 500 ml y, en consecuencia, puede mantenerse en una bolsa de infusión. Por lo tanto, el volumen de cada uno de los componentes del kit es como máximo 50 ml por componente, preferentemente como máximo 25 ml por componente, más preferentemente como máximo 12,5 ml por componente.

Los componentes del kit son estables en almacenamiento durante semanas y meses a temperatura ambiente, o en una temperatura dentro del intervalo de 4-10 °C, antes de mezclarse entre sí y con al menos una solución diluyente para proporcionar una composición enzimática que tiene una actividad desbridante.

Aunque, los componentes del kit de la divulgación se mantienen y almacenan preferentemente en forma de soluciones concentradas, los componentes se pueden mantener en forma seca o sólida (por ejemplo, liofilizada), opcionalmente al vacío. La restauración de una composición seca requiere la disolución en condiciones suaves particulares, ya que la disolución inadecuada, en concreto, la disolución bajo calor o agitación vigorosa, puede dar como resultado una inactivación de proteínas completa o parcial. La disolución incompleta puede dar como resultado concentraciones inadecuadas de los componentes dentro de la composición desbridante final, por lo tanto menor actividad de desbridamiento o falta de la misma.

Medios de almacenamiento apropiados para almacenar cada uno de los componentes del kit en un solo recipiente o en recipientes separados, puede ser cualquier recipiente hecho de materiales inertes que no interactúen con el contenido de cada componente y que sean estables en las condiciones de almacenamiento. Por lo tanto, los recipientes adecuados para almacenar cada componente del kit incluyen una bolsa, un frasco, un vial, un parenteral de gran volumen, un parenteral de pequeño volumen, una jeringa precargada o un cartucho. Las condiciones de almacenamiento incluyen condiciones estériles o asépticas, es decir, cada componente se mantiene preferentemente estéril o aséptico. Como alternativa, el contenido de cada recipiente puede esterilizarse fácilmente. Además, en el aspecto preferido, el contenido total o parcial de cada recipiente puede retirarse mientras se mantiene el recipiente sin contaminar.

Para mantener la solución enzimática altamente concentrada del primer componente inactiva y estable durante semanas y meses, y particularmente, para evitar la auto-digestión, la precipitación, la agregación y la inactivación irreversible durante el almacenamiento, los inventores de la presente divulgación han descubierto que la solución debe mantenerse a un pH ácido, particularmente a un pH dentro del intervalo de 3 a 6, preferentemente de 4 a 5. En dichas condiciones, la actividad potencial de la tiol proteasa se mantiene mientras la tiol proteasa no precipita, se disgrega, es auto-digerida o se agrega. Además, el acetato tampón que permanece en la composición desbridante final, después de que el primer componente del kit se mezcla con los otros componentes y la al menos una solución diluyente, no interfiere sustancialmente en la actividad de desbridamiento de la tiol proteasa. El hecho de que la tiol proteasa en

tales condiciones de almacenamiento no forme agregados y/o precipite es particularmente inesperado en vista del hecho de que en la solución del primer componente, la concentración de la tiol proteasa es extremadamente alta y es de al menos 20 mg/ml, hasta aproximadamente 100 mg/ml.

- 5 Se prefieren los tampones que tienen una capacidad de tampón en un intervalo de pH de 3-6. Tales tampones incluyen, pero no se limitan a, tampón succinato, tampón maleato, tampón citrato, tampón MES, tampón acetato y combinaciones de los mismos.

10 El segundo componente comprende una sustancia reductora que contiene un resto tiol, en el que la sustancia reductora es capaz de activar las proteínas tiol. La concentración de la sustancia reductora dentro del segundo componente es sustancialmente alta, particularmente, al menos 10 veces mayor que su concentración en la composición desbridante final. Aunque altamente concentrado, el agente reductor no precipita, se agrega o pierde su actividad potencial durante el almacenamiento. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan a, sulfuro, cisteína y clorhidrato de cisteína.

15 El kit comprende además un tercer componente que comprende una solución tampón concentrada de modo que cuando el tercer componente se mezcla con dicho segundo componente, dicho primer componente y la al menos una solución diluyente (también denominada en adelante "portador"), la solución tampón se diluye de este modo capaz de mantener la composición desbridante en un intervalo de pH que permite la actividad desbridante de la tiol proteasa y al mismo tiempo adecuada para la aplicación fisiológica, es decir, el uso previsto de la composición desbridante. Por 20 lo tanto, aunque el intervalo de pH que es óptimo para las tiol proteasas, particularmente la papaína, es relativamente amplio, la composición desbridante de la descripción está dentro de un intervalo de pH fisiológicamente aceptable, en concreto, dentro del intervalo de 6,8 a 7,7, preferentemente dentro del intervalo de 7 a 7,6. La concentración del tampón en el tercer componente es alta, particularmente al menos 10 veces mayor que la concentración del tampón 25 en la solución desbridante final.

El tercer componente comprende además al menos un agente quelante.

30 La al menos una solución diluyente que se mezcla con todos los componentes del kit de la divulgación para formar la composición desbridante se puede proporcionar en un recipiente separado con una media de medición que permite medir el volumen exacto de portador requerido para mezclar con los componentes del kit. Como alternativa, el portador puede ser un componente del kit en el volumen exacto requerido para ser mezclado con los otros componentes para formar la composición desbridante. El portador puede proporcionarse en un recipiente al que se añade cada uno de los componentes del kit de la divulgación para formar la composición desbridante final en el recipiente. El recipiente 35 puede ser una bolsa, un frasco, un vial, un parenteral de gran volumen, un parenteral de pequeño volumen, una jeringa precargada o un cartucho. El orden de adición de cada componente a la al menos una solución diluyente es insignificante. Preferentemente, la al menos una solución diluyente es aséptica o estéril o puede tratarse fácilmente con el fin de volverla aséptica o estéril. Además, durante la mezcla de los componentes del kit con la al menos una solución diluyente, la mezcla se mantiene preferentemente sin contaminar. De acuerdo con cierto aspecto, la mezcla se realiza normalmente en condiciones asépticas/estériles.

40 El portador puede ser una solución hiperosmolar tal como una solución salina hiperosmolar, una solución salina que comprende uno o varios agentes osmóticos y una solución salina hiperosmolar que comprende uno o varios agentes osmóticos.

45 La alta osmolaridad es un medio conocido de tratamiento de infecciones, ya que previene el crecimiento de bacterias. La presente divulgación desvela por primera vez que el uso de dicha solución hiperosmolar, promueve la cicatrización de úlceras y heridas al inducir o mejorar la hiperemia.

50 Los kits, composiciones y métodos de la presente divulgación están dirigidos a proporcionar un tratamiento ventajoso para heridas, particularmente úlceras, y preferentemente úlcera crónica tal como úlceras diabéticas. Aproximadamente 16 millones de personas en los Estados Unidos tienen diabetes y aproximadamente el 15 por ciento desarrolla úlceras crónicas del pie y la pierna que son heridas abiertas de cicatrización lenta. Los pacientes con úlceras diabéticas tienen un mayor riesgo de infecciones locales y sistémicas y amputación. La mayoría de las úlceras diabéticas son bastante 55 profundas y también tienen un suministro de sangre inadecuado.

Debido a que el dolor de pequeños cortes o rasguños puede no sentirse debido al daño a los nervios en la zona, y además, la mala circulación ralentiza el tiempo de cicatrización, dicha úlcera puede convertirse en heridas peligrosas antes del diagnóstico. Las úlceras por presión, también conocidas como llagas o úlceras de decúbito, también pueden 60 convertirse en úlceras graves que pueden ser letales. En el caso de úlceras por presión, la zona ulcerada de la piel y el tejido se lesiona o descompone normalmente como consecuencia de un periodo prolongado de presión ininterrumpida u otra agresión continua a la piel. Normalmente, las úlceras por presión se desarrollan cuando la piel y el tejido subyacente se comprimen entre un hueso y una superficie externa, tal como una cama o una silla. Los lugares más comunes para las úlceras por presión son sobre prominencias óseas, tales como el codo, los talones, las caderas, el coxis, los tobillos, los hombros, la espalda y la parte posterior de la cabeza. Generalmente, las úlceras por presión 65 ocurren cuando una persona está sentada o acostada durante demasiado tiempo sin cambiar su peso. Por lo tanto,

aunque cualquier persona confinada en una silla o cama está en riesgo, se observa con mayor frecuencia en ancianos y enfermos. La incontinencia y la disminución de la percepción sensorial, por ejemplo, debido a un accidente cerebrovascular, también aumentan la probabilidad de desarrollar llagas. La presión constante contra la piel aprieta los vasos sanguíneos que suministran nutrientes y oxígeno a la piel y al tejido cercano parcial o completamente cerrado, lo que provoca una disminución del suministro de sangre a la zona. La ausencia o reducción severa de oxígeno y nutrientes, da como resultado la muerte de la piel y, potencialmente, de los tejidos subyacentes. Si se deja sin tratar, el tejido cercano comienza a morir, lo que finalmente da como resultado una úlcera que también puede afectar al hueso. La ulceración severa, es decir, el resultado de una abertura en la piel puede proporcionar una entrada para infecciones secundarias; en casos particularmente graves, las úlceras de decúbito pueden causar la muerte.

Regímenes de tratamiento y dosificación

La dosis típica útil para desbridar tejido necrótico de acuerdo con la presente divulgación se determina de acuerdo con la gravedad de la lesión. De manera habitual, un flujo de una solución desbridante que comprende una tiol proteasa de acuerdo con cualquiera de las formulaciones detalladas en el presente documento, se transporta sobre y a través de la lesión durante al menos una hora. La lesión se controla para evaluar el progreso del desbridamiento. Una pausa en el tratamiento durante cortos periodos de tiempo se lleva a cabo mediante la detención del flujo y la eliminación de cualquier conducto que impida el libre movimiento del paciente. Se puede dejar un apósito oclusivo al que se vuelven a unir los conductos sobre la lesión.

El tratamiento puede aplicarse usando un aparato como se describe en los documentos US2004/0186421 o WO2005/070480 del inventor de la presente divulgación. Dicho aparato comprende una carcasa que tiene al menos una abertura formada en la misma y medios para fijar el aparato a la piel alrededor de la circunferencia de la lesión cutánea, en el que dicha carcasa comprende (i) al menos un tubo de entrada que tiene un primer eje longitudinal y configurado para ser ajustable a lo largo de su eje longitudinal a través de dicha al menos una abertura; y (ii) al menos un tubo de salida que tiene un segundo eje longitudinal. El aparato comprende además un depósito adaptado para contener la solución desbridante, estando el depósito en comunicación fluida con la una o más entradas. Una salida puede comprender válvulas para controlar el flujo entre el depósito y la zona de tratamiento. Preferentemente, una salida puede comprender además medios que permiten desconectar y reconectar la carcasa del depósito, permitiendo así pausar el tratamiento.

La simplicidad de desconectar y reconectar al paciente de los medios de flujo y las composiciones desbridantes permite aplicar el tratamiento desbridante durante periodos prolongados. Un flujo de la solución desbridante puede durar al menos una hora y también puede durar varias horas, según las necesidades individuales.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de una composición desbridante I a partir de soluciones concentradas estables y transparentes.

Se proporcionó un kit que contenía los siguientes componentes:

1. Una solución enzimática (25 ml) de papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000 con actividad específica de 30.000 U USP/mg, 40 mg/ml) en tampón acetato 0,05 M, pH 4,3-4,5 que contiene el 10 % (v/v) de glicerol.
2. Clorhidrato de cisteína, 25 ml, 0,1 M, pH 1,4.
3. Tris/EDTA, 25 ml de 2 M/0,04 M, pH 7,85

Todas las soluciones eran transparentes y no contenían precipitados ni agregados. Las tres soluciones se diluyeron mediante su adición en una solución de 500 ml que contenía solución salina al 0,9 % para proporcionar una solución con un pH final de $7,4 \pm 0,2$ y concentraciones finales de tampón Tris 0,1 M, cisteína HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 mg/ml de papaína y un 0,5 % de glicerol en solución salina al 0,9 %.

Ejemplo 2. Preparación de una composición desbridante II a partir de soluciones concentradas estables y transparentes.

Se proporcionó un kit que contenía los siguientes componentes:

1. Una solución enzimática (25 ml) de papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000 con actividad específica de 30.000 U USP/mg, 40 mg/ml) en tampón acetato 0,05 M, pH 4,3-4,5 que contiene el 10 % (v/v) de glicerol.
2. Clorhidrato de cisteína, 25 ml, 0,1 M, pH 1,4.
3. Tris/EDTA, 25 ml de 2 M/0,04 M, pH 7,85

Todas las soluciones eran transparentes y no contenían precipitados ni agregados. Las tres soluciones se diluyeron mediante su adición en una solución de 500 ml que contenía solución salina al 5 % (p/v) para proporcionar una solución hiperosmolar con un pH final de $7,4 \pm 0,2$ y concentraciones finales de tampón Tris 0,1 M, cisteína HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 mg/ml de papaína y un 0,5 % de glicerol en solución salina al 5 %.

Ejemplo 3. Preparación de una composición desbridante III a partir de soluciones concentradas estables y transparentes.

5 Se proporcionó un kit que contenía los siguientes componentes:

1. Una solución enzimática (25 ml) de papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000 con actividad específica de 30.000 U USP/mg, 40 mg/ml) en tampón acetato 0,05 M, pH 4,3-4,5 que contiene el 10 % (v/v) de glicerol.

2. Clorhidrato de cisteína, 25 ml, 0,1 M, pH 1,4.

10 3. Tris/EDTA, 25 ml de 2 M/0,04 M, pH 7,85

Todas las soluciones eran transparentes y no contenían precipitados ni agregados. Las tres soluciones se diluyeron mediante su adición en una solución de 500 ml que contenía glicerol al 10 % (v/v) para proporcionar una solución hiperosmolar con un pH final de $7,4 \pm 0,2$ y concentraciones finales de tampón Tris 0,1 M, cisteína HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 mg/ml de papaína en el 10,5 % de glicerol.

15

Ejemplo 4. Preparación de una composición desbridante IV a partir de soluciones concentradas estables y transparentes.

20 Se proporcionó un kit que contenía los siguientes componentes:

1. Una solución enzimática (25 ml) de papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000 con actividad específica de 30.000 U USP/mg, 40 mg/ml) en tampón acetato 0,05 M, pH 4,3-4,5 que contiene el 10 % (v/v) de glicerol.

2. Clorhidrato de cisteína, 25 ml, 0,1 M, pH 1,4.

25 3. Tris/EDTA, 25 ml de 2 M/0,04 M, pH 7,85

Todas las soluciones eran transparentes y no contenían precipitados ni agregados. Las tres soluciones se diluyeron mediante su adición en una solución de 500 ml que contenía glicerol al 10 % (v/v) y solución salina al 0,9 % (p/v) para proporcionar una solución hiperosmolar con un pH final de $7,4 \pm 0,2$ y concentraciones finales de tampón Tris 0,1 M, cisteína HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 mg/ml de papaína en glicerol al 10,5 % en solución salina al 0,9 %.

30

Ejemplo 5. Preparación de una composición desbridante V a partir de soluciones concentradas estables y transparentes.

35 Se proporcionó un kit que contenía los siguientes componentes:

1. Una solución enzimática (25 ml) de papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000 con actividad específica de 30.000 U USP/mg, 40 mg/ml) en tampón acetato 0,05 M, pH 4,3-4,5 que contiene el 10 % (v/v) de glicerol.

2. Clorhidrato de cisteína, 25 ml, 0,1 M, pH 1,4.

40 3. Tris/EDTA, 25 ml de 2 M/0,04 M, pH 7,85

Todas las soluciones eran transparentes y no contenían precipitados ni agregados. Las tres soluciones se diluyeron mediante su adición a una solución de 500 ml que contenía glicerol al 10 % (v/v) y solución salina al 5 % (p/v) para proporcionar una solución hiperosmolar con un pH final de $7,4 \pm 0,2$ y concentraciones finales de tampón Tris 0,1 M, cisteína HCl 5 mM, EDTA 2 mM, 2 mg/ml de papaína en glicerol al 10,5 % en solución salina al 5 %.

45

Ejemplo 6: desbridamiento de heridas haciendo fluir una solución desbridante sobre un modelo de herida porcina I:

Preparación del animal y protocolo de tratamiento:

50 Se sedaron y anestesiaron cerdos hembra *Large white* maduros, con un peso aproximado de 30 kg, con inyección intramuscular de ketamina (100 mg/ml) 20 mg/kg de peso corporal, xilamina al 10 % (2 mg/kg de peso corporal) y atropina 0,02 mg/kg de peso corporal. El cerdo se mantuvo bajo anestesia general en una mezcla inhalada de halotano e isoflurano (1,5-3 %) en oxígeno puro y por infusión intravenosa de solución de Hartman (lactato de Ringer) a una velocidad constante de 30-50 gotas/min.

55

Se indujeron cinco heridas en la piel miocutáneas de doble colgajo en el plano dorsal del lomo de los cerdos, en las regiones paravertebrales, de 9 x 3 cm de tamaño, (que se extendían hasta la capa muscular) de acuerdo con Swindle (Swindle MM. Surgery, anesthesia and experimental techniques in swine. Iowa State University Press, Estados Unidos. págs. 74-77. 1998). Siete días después de la inducción de la herida, bajo anestesia general, las heridas se expusieron proporcionando una abertura de 3,5 cm x 3,5 cm y se colocaron dispositivos (Dermastream™; WO03/011369, US 2004/0186421 y WO2005/070480) sobre la herida y se unieron al entorno de la piel y sus partes de entrada y salida se conectaron al depósito de solución y a las bolsas de recolección de fluidos, respectivamente.

60

65 Cuatro de cada 5 heridas fueron sometidas a un flujo controlado de 6-11 horas de enzima o solución salina durante un periodo de 6-11 horas a un caudal de 1 ml / min. Una herida sirvió como control no tratado.

La solución de enzima desbridante contenía papaína (Merck N.º de cat. 1.07149.5000, con una actividad específica de 30.000 U USP/mg) a una concentración de 60.000 U USP/ml, preparada de acuerdo con el ejemplo 1.

5 Después del tratamiento de 6-11 horas, se terminó la transmisión, se retiró el DermaStream™ de todas las heridas y la cámara Nikon con zoom S3 Pro realizó una documentación fotográfica de la superficie de cada área de la herida a una distancia de 20 cm de la superficie de la herida y un ángulo de ~45 ° w en alta resolución. El área incluía todo el sitio de la herida y los márgenes.

10 Los cerdos se sacrificaron mediante inyección intramuscular de Pental (200 mg/ml) 1 ml/1,5 kg de peso corporal y se extrajeron biopsias de todas las heridas, que contenían muestras longitudinales del área de la herida, de 1x4 cm de tamaño. Las biopsias incluyeron el margen normal de la piel, así como las capas musculares subyacentes no heridas. Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 48 horas y se incluyeron en parafina. Se recogió una sección/corte aleatorio y representativo (8 µm), desde el margen normal hasta el borde del margen de la herida, de
15 cada bloque y se tiñó con la técnica de tinción con hematoxilina eosina.

El efecto desbridante de la corriente de solución de papaína preparada según el ejemplo 1 durante 6 horas u 11 horas en un modelo de herida porcina se presenta en secciones histológicas que se muestran en la figura 1, en comparación con una herida no tratada. Los resultados indican claramente un desbridamiento significativo ya afectado después del
20 tratamiento único de 6 horas.

Ejemplo 7: desbridamiento de heridas haciendo fluir una solución desbridante sobre un modelo de herida porcina II

Los resultados de hacer fluir la solución descrita en el ejemplo 2 se aplicaron sobre una herida porcina diferente
25 durante 6 horas u 11 horas, empleando la configuración experimental descrita en el ejemplo 6 se presentan en la figura 2. Los resultados indican un desbridamiento efectivo logrado después de 6 horas y una limpieza sustancial alcanzada dentro de las 11 horas con un aspecto distintivo de hiperemia.

Ejemplo 8: desbridamiento de heridas haciendo fluir una solución preparada de acuerdo con la divulgación sobre un
30 modelo de herida porcina III

Los resultados de hacer fluir la solución descrita en el ejemplo 3 durante 6 horas y 11 horas empleando la configuración experimental descrita en el ejemplo 6 se presentan en la figura 3. Los resultados indican un desbridamiento efectivo alcanzado después de 6 horas.

Ejemplo 9: desbridamiento de heridas haciendo fluir una solución preparada de acuerdo con la divulgación sobre un
35 modelo de herida porcina IV

Los resultados de hacer fluir la solución descrita en el ejemplo 5 durante 11 horas empleando la configuración experimental descrita en el ejemplo 6 se presentan en la figura 4. Los resultados indican desbridamiento efectivo.

El impacto de diferentes composiciones desbridantes sobre la morfología y la apariencia del desbridamiento de heridas necróticas se demuestra en la figura 5: A - papaína (40 mg/ml) en solución salina al 5 % durante 6 h (paneles izquierdos - antes del tratamiento y paneles derechos - después del tratamiento); B - papaína (40 mg/ml) en solución salina al 0,9
45 % y glicerol al 10 % durante 6 horas; C - papaína (40 mg/ml) en solución salina al 5 % y glicerol al 10 % durante 6 h.

Ejemplo 10: prueba de seguridad - irritación cutánea aguda

El estudio de irritación cutánea aguda se llevó a cabo en conejos hembra New Zealand (NZW) (n=3), 3,0-3,4 kg para la evaluación del potencial de reacción de irritación dérmica de una solución desbridante que comprende 2 mg/ml (también denominada en lo sucesivo "Enzystem™").

En todos los conejos, 4-24 horas antes de la aplicación de las soluciones probadas en los sitios designados en el lomo de los conejos, se eliminó el pelaje recortando estrechamente ambos lados de la columna vertebral. En el lomo de cada conejo, se prepararon 2 sitios de control y 2 sitios tratados, de aproximadamente 2,5x2,5 cm cada uno. Los dos
55 sitios probados en cada conejo se sometieron a 0,5 ml de solución desbridante final Enzystem™ y los 2 sitios probados restantes se trataron con el mismo volumen de solución salina. Las soluciones probadas se aplicaron primero a parches de gasa que luego se aplicaron directamente a los sitios respectivos durante un periodo de 4 horas. Al final del periodo de exposición de 4 horas, se retiraron los parches.

60 Observación y examen: se observaron conejos durante un periodo de 72 horas después de la retirada de los parches. Se realizó un periodo de observación prolongado más allá de las 72 horas en casos de reacciones persistentes en la piel y se observó animal una vez al día hasta que se observó reversibilidad o hasta un máximo de 14 días después de la aplicación. Los signos de eritema y edema (según los grados de reacciones cutáneas) y la respuesta en los sitios de aplicación se evaluaron tras 1, 4, 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. En los casos en que los animales fueron monitorizados durante hasta 14 días, se realizaron exámenes adicionales una vez al día. El examen de
65

cualquier efecto adverso sistémico se llevó a cabo una vez al día durante todo el periodo de estudio.

Los pesos corporales se midieron antes de la aplicación de la solución en los sitios de prueba y al finalizar el estudio (después de 72 horas o 14 días en caso de un periodo de observación prolongado).

Evaluación de datos: la evaluación de los posibles efectos de irritación de las soluciones probadas se basó en la determinación de la escala del Índice de irritación primaria (PII) usando el índice de irritación Draize para eritema y edema (Draize, UL. : Dermal toxicity in appraisal of the safety of chemicals in food, drugs and cosmetics. The association of food and drug officials of the United States, Bureau of food and drug, Austin, TX. 1959 Páginas: 46-59) y se comparó con las "categorías de respuesta a la irritación en el conejo" como se especifica en la norma ISO 10993-10. Se evaluó el PII de los sitios de aplicación: inmediatamente tras 1 hora, después de 4 horas de aplicación del parche y a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento.

Resultados: las respuestas generales de irritación dérmica en todos los conejos causaron una reacción "insignificante" a "leve" de acuerdo con la puntuación PII (0-1,9) con un promedio de 1,05 ("leve"). Además, no hubo signos clínicos en respuesta a ninguna solución probada en ninguno de los conejos, así como tampoco cambios anormales en el peso corporal durante todos los periodos de estudio.

Ejemplo 11: prueba de seguridad - toxicología aguda durante una infusión de 1 hora

Estudio de toxicología aguda de infusión i.v. 1 hora de la solución EnzyStream™ en ratas macho *Sprague Dawley* (n=12), 270-275 g, para evaluación de seguridad.

Todas las ratas fueron anestesiadas con anestesia con gas halotano durante 70-80 min para inserción e infusión yugular mediante catéter. Se insertó un catéter de polietileno lleno de solución salina-heparina en la vena yugular. Se realizó una infusión automática lenta de formulaciones probadas (solución salina de control o solución EnzyStream™) de 1 ml de una solución de papaína de 1 mg/ml durante una hora. Cinco ratas fueron sometidas a solución salina, mientras que 7 ratas fueron tratadas con solución EnzyStream™.

Justificación de la dosis: la cantidad de solución administrada fue de 1 ml/animal con un peso de ~250 g. La concentración de la enzima papaína administrada fue de 1 mg/ml. Estas cantidades se calcularon de acuerdo con los pesos corporales de los animales y humanos y los volúmenes de circulación sanguínea para representar la absorción potencial del 50 % de la solución enzimática que se hizo fluir por un área de la herida tratada durante una sesión de flujo en ensayos clínicos. Se puede suponer que este valor es ~x100 más alto que la cantidad que puede ser absorbida prácticamente durante el tratamiento de úlceras venosas/diabéticas en ensayos clínicos. Esta suposición se basa en la mala circulación sanguínea de las úlceras diabéticas y venosas y se puede suponer que la penetración de líquidos en el cuerpo/sistema sanguíneo es, por lo tanto, mínima.

Una hora después de la infusión, se retiró el catéter y se suturaron la vena y la piel. Los animales se monitorizaron durante los siguientes 14 días y se sacrificaron mediante inyección de Pental (200 mg/ml) 1 ml/1,5 kg de peso corporal.

Parámetros fisiológicos y bioquímicos: el peso corporal (PC) se midió antes de la infusión i.v. y 24, 48, 72 horas, 7 y 14 días después de la infusión.

La temperatura y los electrocardiogramas (ECG) se midieron antes de la infusión, cada 10 minutos durante la infusión y 3, 24, 48, 72 horas, 7 y 14 días después de la infusión.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena de la cola para hemograma completo, funciones hepáticas y renales, y electrolitos antes del periodo de infusión y 3, 24, 48, 72 horas, 7 y 14 días después de la infusión.

La vitalidad y los patrones normales de comportamiento de comer, beber, secreciones urinarias y fecales fueron monitorizados diariamente.

Histología: después de 14 días, biopsias de los siguientes órganos principales: corazón; pulmón; riñón y suprarrenal; hígado; esófago; tráquea; tiroides; páncreas; timo; cartílago xifoides; bazo y articulación de la rodilla se extrajeron de todas las ratas y se fijaron inmediatamente en formaldehído tamponado con fosfato al cuatro por ciento durante 48 horas, se procesaron mediante procedimientos histológicos de rutina y se incluyeron en parafina.

Se cortaron secciones en serie a 8 µm de espesor. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se tomaron para examen histológico en busca de efectos tóxicos.

Resultados: durante el periodo de aclimatación previo al inicio de la infusión i.v., todos los parámetros monitorizados de las ratas estaban dentro de los intervalos fisiológicos normales. El peso corporal (PC), la temperatura rectal, la frecuencia cardíaca, los análisis de sangre para las funciones hepáticas y renales, así como para los niveles de electrolitos en la sangre, no mostraron diferencias estadísticas entre el control de solución salina y los grupos tratados experimentalmente, y todos estaban dentro del intervalo de datos normal. Se demostró un perfil dinámico similar de

los cambios de PC en los grupos experimentales y de control: el PC disminuyó ligeramente durante los primeros 3 días después del procedimiento de infusión y comenzó a aumentar en el día 4 y finalmente fue incluso mayor que los datos de PC previos a la infusión.

5 No se detectaron anomalías en las secciones histológicas de 12 órganos internos examinados de ambos grupos de animales. A nivel histológico, todos los órganos y tejidos de todos los animales analizados (tratados con solución salina o tratados con papaína), mostraron un patrón histológico normal sin cambios patológicos, morfológicos u otros efectos adversos

10 Los resultados obtenidos en las condiciones experimentales descritas anteriormente demuestran claramente la ausencia de efectos secundarios tóxicos para la formulación probada de solución desbridante Enzystream™ infundida durante 1 hora en ratas.

Ejemplo 12: prueba de seguridad - toxicología aguda durante una infusión de 6 horas

15 La evaluación de seguridad de la infusión intravenosa de la solución Enzystream™ a la misma dosis descrita en el ejemplo 11 (un ml de solución de papaína de 1 mg/ml) durante la infusión intravenosa aguda (*i.v.*) prolongada de 6 h se llevó a cabo en 8 ratas *Sprague Dawley* (4 machos y 4 hembras), 270-275 g, ratas conscientes anestesiadas.

20 Métodos: todas las ratas se insensibilizaron al dolor con una sola inyección subcutánea de Flunixin Meglumina y después se anestesiaron mediante inyección de Ketamina-Xilasina para preparar la preparación experimental. Se insertó un tubo de polietileno lleno de solución salina heparinizada en la vena yugular. Después de aproximadamente una hora, cuando los animales regresan a un estado de consciencia, se inició la infusión lenta y automática de las formulaciones probadas (control-solución salina o Enzystream™) mediante la bomba de infusión 1 conectada a un extremo de un pasaje alargado 3 a través de un elemento giratorio 2, en el que el segundo extremo del pasaje 3 está en comunicación con la piel del animal a través de la correa y la silla 4 (figura 6). El pasaje 3 puede comprender un resorte de acero inoxidable. La velocidad de infusión fue de 2,77 µl/min de un ml de la solución de papaína de 1 mg/ml durante 6 horas. Cuatro ratas se sometieron a infusión salina mientras que a otras 4 ratas se les administró solución Enzystream™.

30 Después de 6 horas de infusión, se retiró la cánula y se suturaron la vena y la piel. Los animales fueron monitorizados durante 14 días y sacrificados por asfixia con CO₂.

35 Parámetros fisiológicos y bioquímicos: el peso corporal se midió antes de la infusión *i.v.* y 2, 4, 7 y 14 días después de la infusión.

Los signos clínicos se registraron diariamente durante todo el periodo de observación de 14 días. Las observaciones incluyeron cambios en la piel, pelaje, ojos, membranas mucosas, aparición de secreciones y excreciones, actividad autónoma (por ejemplo, lagrimeo, salivación, piloerección, tamaño de la pupila y patrón respiratorio inusual).

40 La vitalidad y los patrones normales de comportamiento de comer, beber, secreciones de orina y heces también fueron monitorizados diariamente.

45 Se obtuvieron muestras de sangre para hemograma completo, funciones hepáticas y renales, y electrolitos de la vena yugular mediante la cánula antes del periodo de infusión y después de 24 horas. Al finalizar el periodo de observación, antes del sacrificio, se obtuvo una muestra de sangre del seno retroorbital.

50 Histología: biopsias de los siguientes órganos principales: corazón; pulmón; riñón y suprarrenal; hígado; esófago; tráquea; tiroides; páncreas; timo; cartílago xifoides; bazo, articulación de la rodilla y cerebro se extrajeron de todas las ratas y se conservaron inmediatamente en solución de formaldehído al 4 % durante 48 horas, se procesaron mediante procedimientos histológicos de rutina y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones en serie a 8 µm de espesor. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se tomaron para examen histológico en busca de efectos tóxicos.

55 Resultados: durante el periodo de aclimatación previo al inicio de la infusión *i.v.*, todos los parámetros monitorizados de las ratas estaban dentro del intervalo fisiológico normal.

Parámetros fisiológicos: no se observaron signos clínicos notables durante todo el periodo de estudio en las ratas tratadas con solución salina control o tratadas con Enzystream™.

60 Las determinaciones de peso corporal revelaron en ambos grupos una ligera y transitoria pérdida de peso corporal en los días 2 y 4, pero en el día 7 después de la infusión, todos los animales en ambos grupos demostraron aumento de peso.

65 El examen de los parámetros de la bioquímica clínica, como las funciones hepáticas y renales y los electrolitos en muestras de sangre recogidas antes y después de las 24 horas posteriores a la infusión, se encontraban dentro del intervalo normal en los grupos de control y tratados con Enzystream™. La determinación de los parámetros de

hematología y bioquímica obtenidos al finalizar el periodo de estudio de 14 días de ambos grupos reveló valores que también estaban dentro del intervalo normal.

5 Hallazgos histológicos: a nivel de necropsia, no se observaron hallazgos patológicos graves en ambos grupos. A nivel histológico, todos los órganos y tejidos de todos los animales (tratados con solución salina o tratados con Enzystream™), mostraron un patrón histológico normal sin ningún cambio patológico, morfológico u otros efectos adversos.

10 Conclusiones: los resultados obtenidos en este estudio de seguridad en las condiciones experimentales descritas anteriormente, demuestran claramente que no hay efectos secundarios tóxicos para la solución desbridante Enzystream™ cuando se infunde por vía intravenosa durante 6 horas.

Ejemplo 13: vida útil

15 Estabilidad en almacenamiento (vida útil) de la solución concentrada de papaína que contiene cantidades variables de glicerol y NaCl y almacenada a 4 °C.

20 Métodos: se prepararon tres soluciones enzimáticas concentradas (40 mg/ml de papaína 30.000 U USP/mg cada una), que contenían cantidades variables de glicerol y NaCl de la siguiente manera: (I) 5 % de glicerol + 0 % de NaCl; (II) 30 % de glicerol + 0 % de NaCl y (III) 30 % de glicerol + 18 % de NaCl. Las soluciones enzimáticas concentradas se almacenaron a 4 °C, en tubos herméticamente cerrados envueltos en papel de aluminio hasta su uso.

25 En cada punto de verificación, se extrajo una muestra de cada tubo y se sometió a un bioensayo de papaína con sustrato BAPNA estándar preformado con soluciones tampón y activadora de cisteína recién preparadas.

La actividad enzimática residual se caracterizó comparando la pendiente de la reacción durante 10 minutos a 410 nm.

30 Resultados: como se demuestra en las figuras 7A y 7B, una composición enzimática que comprende el 30 % de glicerol y el 18 % de NaCl exhibe la actividad enzimática residual más alta. La mayor parte, aproximadamente el 90 %, de la pendiente inicial de la reacción enzimática se mantuvo estable durante los 12 meses de incubación a 4 °C. El análisis de la pendiente (figura 7B) indica una disminución más rápida en la cinética de reacción durante los primeros 3 meses seguida de la estabilización de la actividad residual, un fenómeno bien documentado para estudios de estabilidad en almacenamiento de enzimas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un concentrado no activo de una tiol-proteasa, siendo dicho concentrado un concentrado hipertónico y comprendiendo al menos 20 mg/ml de una forma inactiva de dicha tiol proteasa y comprendiendo además al menos un agente osmótico, en la que dicho al menos un agente osmótico comprende glicerol y cloruro de sodio, y en la que la concentración de glicerol es como máximo el 30 % v/v y la concentración de cloruro de sodio es al menos el 1 % p/v y como máximo 18 % p/v, y en la que dicho concentrado tiene un pH dentro del intervalo de pH 3-6, y es estable durante al menos 1 semana a temperatura ambiente o a una temperatura dentro del intervalo de 4-10 °C y dicha tiol-proteasa se reactiva por dilución para poseer actividad proteolítica dentro del intervalo de 5.000 a 50.000 unidades USP/mg.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha tiol proteasa es papaína.
3. La composición de la reivindicación 1, en la que la concentración de la tiol proteasa está dentro del intervalo de 25 a 45 mg/ml.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho agente osmótico puede comprender además una sustancia seleccionada del grupo que consiste en manitol, dextrano, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que el concentrado no activo está desprovisto de material particulado.
6. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un tampón, seleccionado entre el grupo que consiste en: tampón ácido N-(2-acetamido)-2-iminodiacético, tampón acetato, tampón succinato, tampón maleato, tampón citrato, tampón MES y combinaciones de los mismos, preferentemente solución de acetato.
7. Un kit para preparar una composición desbridante, comprendiendo el kit un primer componente que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6; un segundo componente que comprende una solución concentrada de al menos un agente reductor; y un tercer componente que es una solución tampón concentrada que comprende al menos un agente tamponante y al menos un agente quelante, en el que mezclar dichos primer, segundo y tercer componentes en al menos una solución diluyente proporciona una solución desbridante que tiene un pH fisiológico y en el que dicha tiol-proteasa en dicha solución desbridante posee actividad proteolítica dentro del intervalo de 5.000 a 50.000 unidades USP/mg.
8. El kit de la reivindicación 7, en el que la tiol proteasa es papaína.
9. El kit de la reivindicación 7, en el que el primer componente comprende un tampón seleccionado del grupo que consiste en: tampón acetato, tampón succinato, tampón maleato, tampón citrato, tampón MES y combinaciones de los mismos.
10. El kit de la reivindicación 7, en el que el primer componente es estable en almacenamiento en una temperatura dentro del intervalo de 4-10 °C.
11. El kit de la reivindicación 7, en el que el al menos un agente reductor es un compuesto de tiol seleccionado del grupo que consiste en: sulfuro, cistamina, glutatión, N-acetilcisteína, cisteína y clorhidrato de cisteína.
12. El kit de la reivindicación 7, en el que el pH del segundo componente está dentro del intervalo de pH 1 a 4.
13. El kit de la reivindicación 7, en el que el tercer componente comprende un agente tamponante seleccionado del grupo que consiste en: tampón tris hidroximetilaminoetano (Tris), tampón Hepes, tampón lisina, tampón glicina, tampón MOPS, tampón imidazol y tampón MES.
14. El kit de la reivindicación 7, en el que después de mezclar los primer, segundo y tercer componentes y la al menos una solución diluyente, el agente tamponante mantiene un pH dentro del intervalo de pH fisiológico.
15. El kit de la reivindicación 7, en el que la al menos una solución diluyente comprende una solución seleccionada del grupo que consiste en: solución salina, solución salina hiperosmolar y solución salina que comprende al menos un agente osmótico.
16. El kit de la reivindicación 15, en el que el al menos un agente osmótico comprende uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en: cloruro de sodio, glicerol, manitol, dextrano, polietilenglicol y combinaciones de los mismos.
17. El kit de la reivindicación 15, en el que la solución salina hiperosmolar comprende al menos el 1 % p/v de cloruro de sodio.
18. El kit de la reivindicación 7, en el que la relación de volumen entre cada componente del kit y el volumen de la

solución desbridante es al menos 1:10.

19. Uso del kit de la reivindicación 7, opcionalmente en combinación con un apósito, en la preparación de un medicamento para desbridar una lesión cutánea o una piel dañada.

5

20. El uso de la reivindicación 19, en el que la tiol proteasa es papaína.

21. El uso de la reivindicación 19, en el que la lesión es una úlcera crónica.

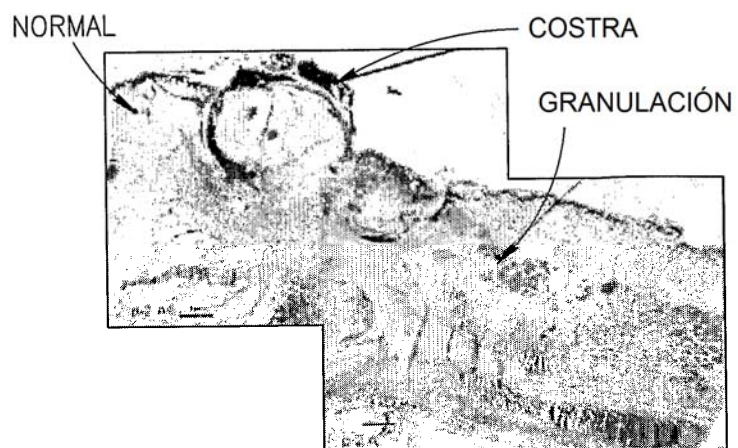


FIG.1A

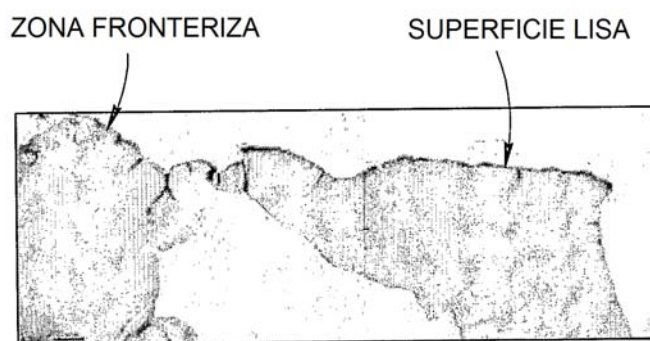


FIG.1B

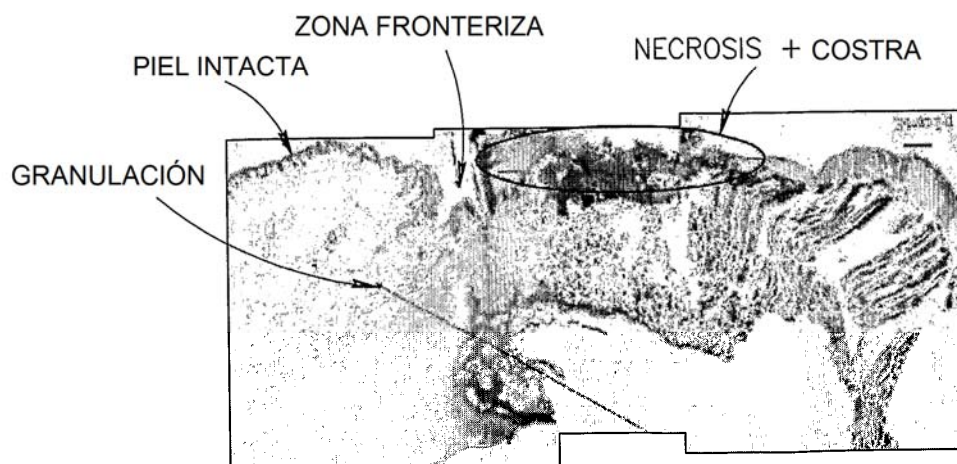


FIG.1C

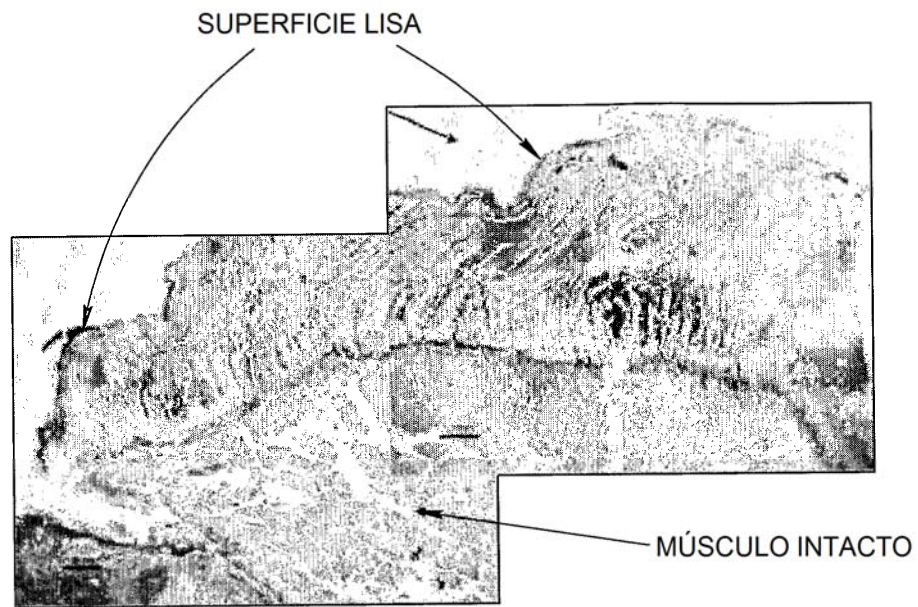


FIG.2A

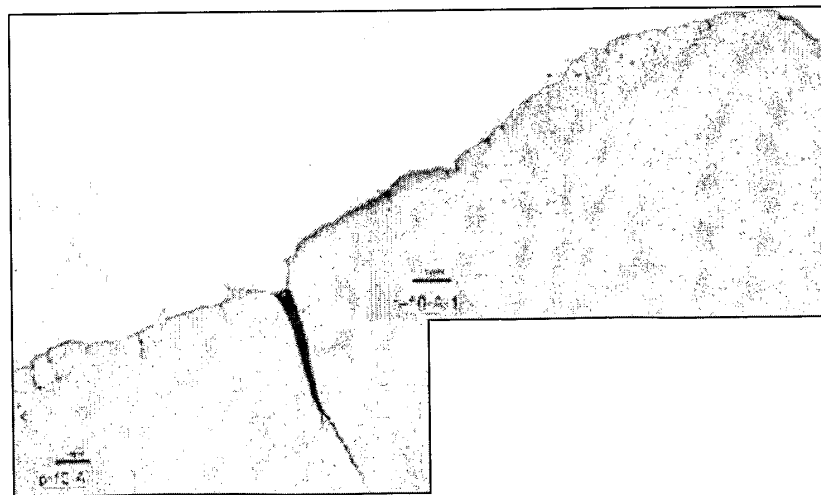


FIG.2B

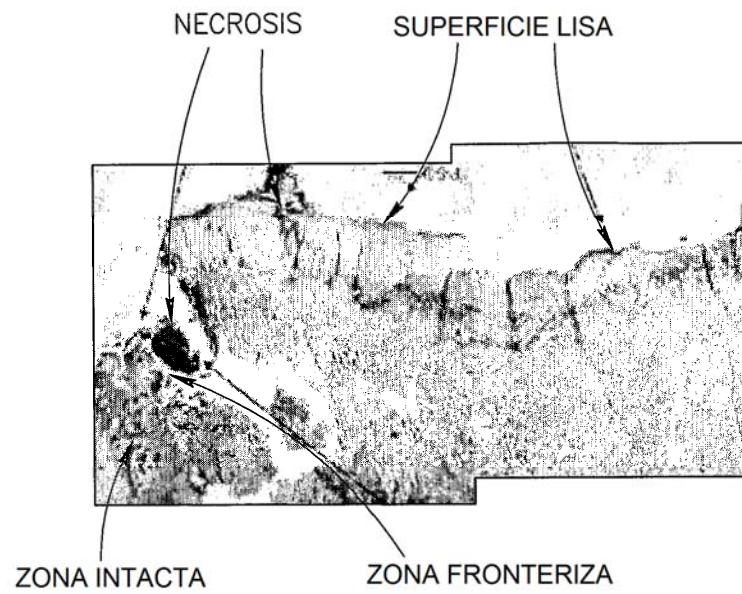


FIG.3A

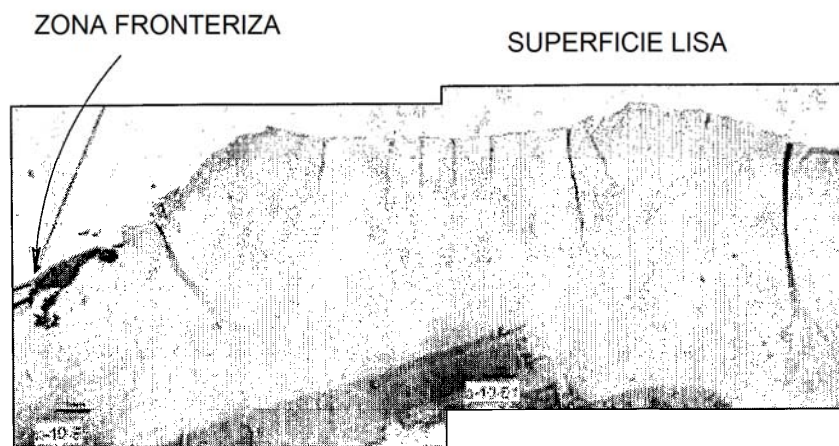


FIG.3B

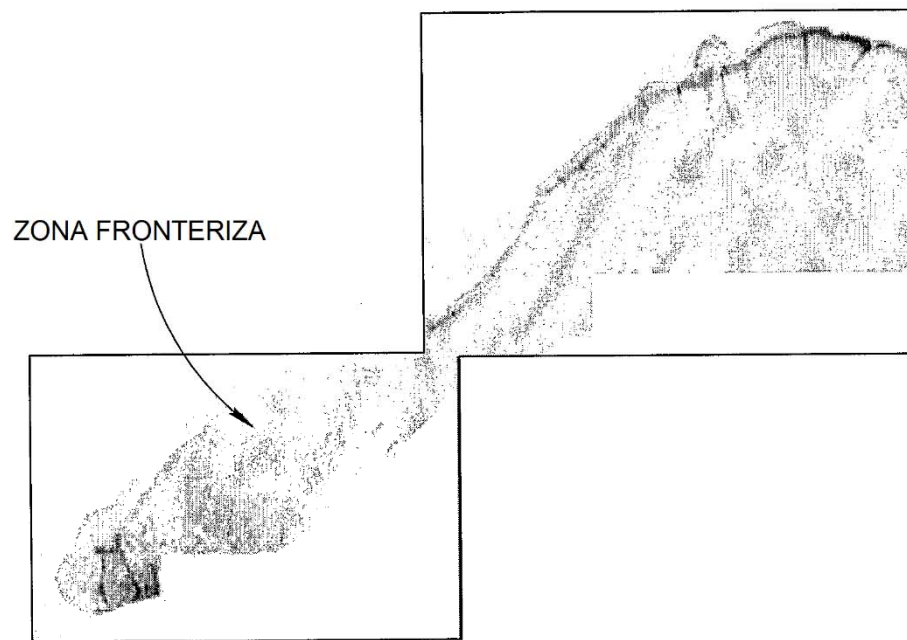


FIG.4

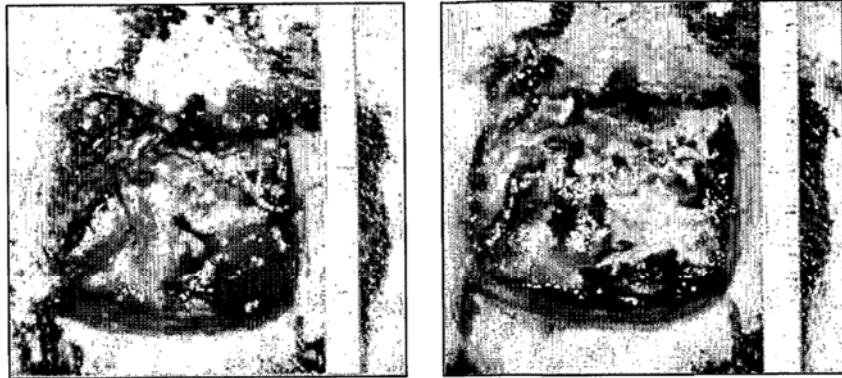


FIG.5A



FIG.5B

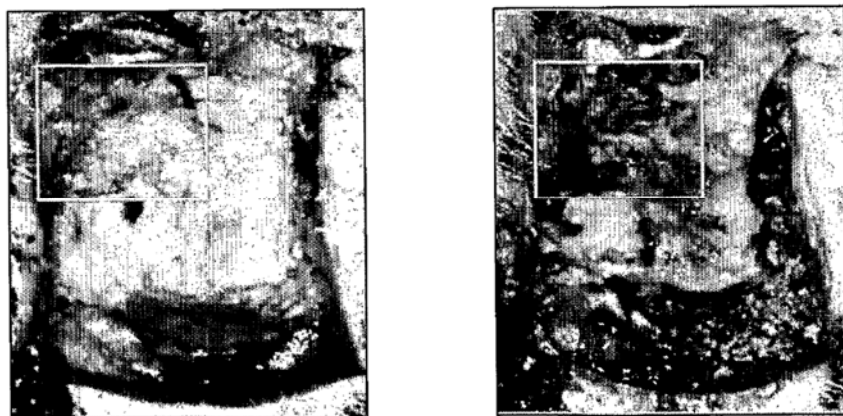


FIG.5C

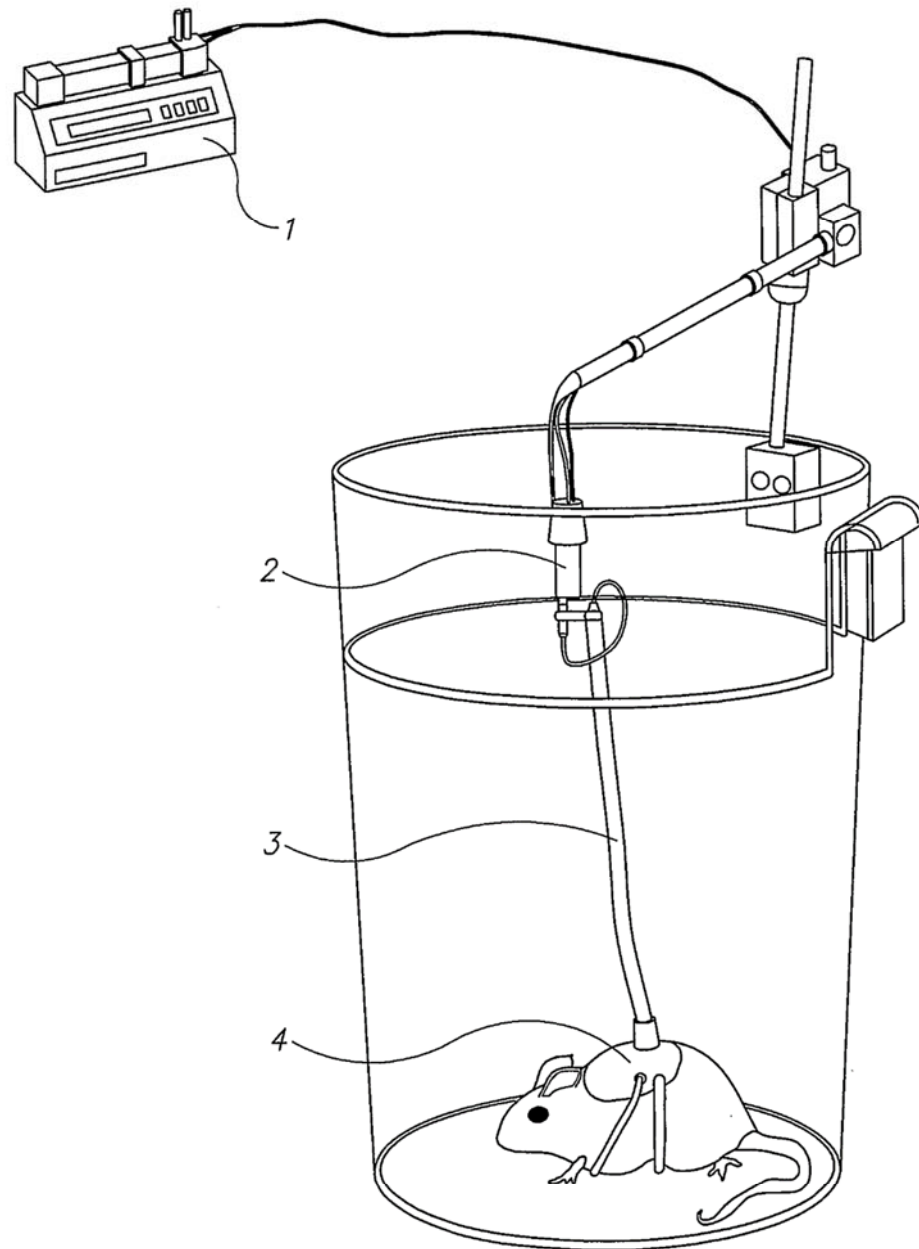


FIG.6

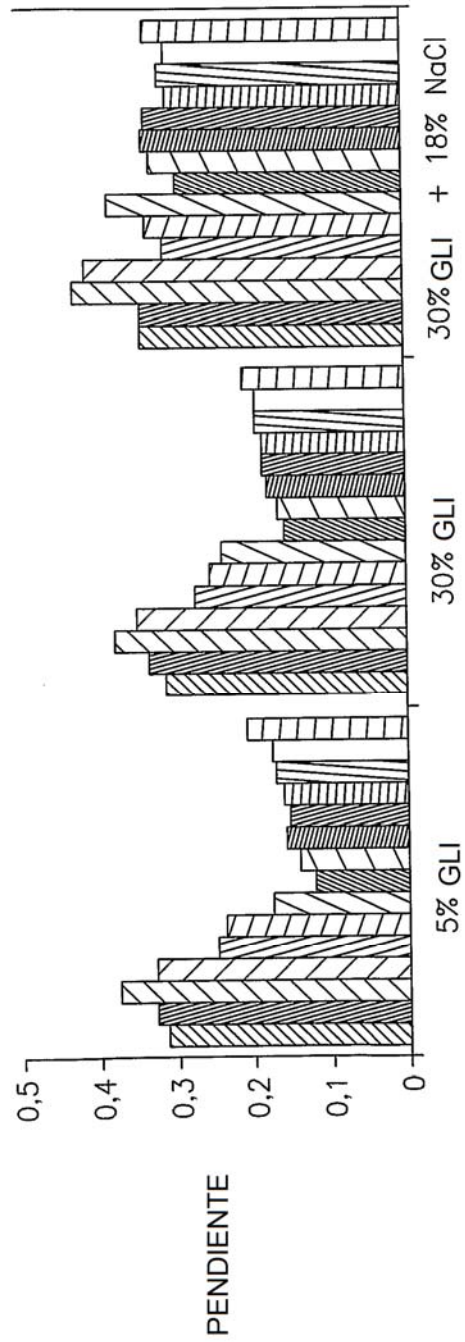
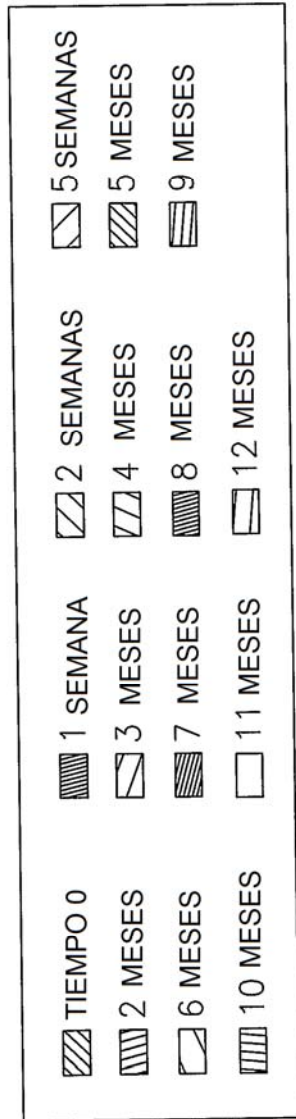


FIG. 7A

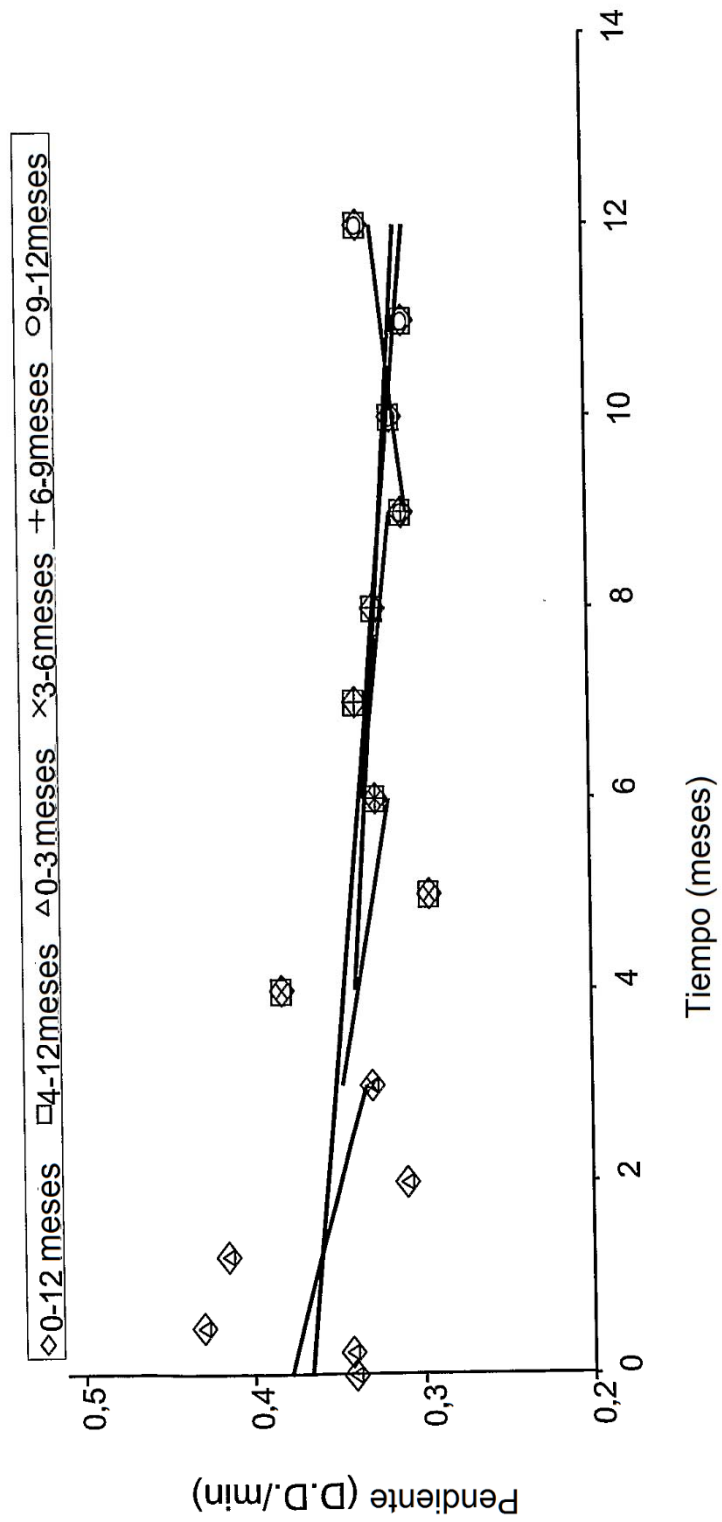


Fig. 7B