



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 939**

51 Int. Cl.:
A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97903850 .2**

96 Fecha de presentación : **03.01.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0871763**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.1998**

54 Título: **Método para la preparación de colágeno de Tipo II.**

30 Prioridad: **05.01.1996 US 9723 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2009

73 Titular/es: **AUTOIMMUNE, Inc.**
1199 Madia Street
Pasadena, California 91103, US

72 Inventor/es: **Devore, Dale, P. y**
Sturrock, Anna, G.

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 320 939 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 la preparación de colágeno de Tipo II.

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para procesar tejido natural que contiene colágeno de Tipo II a efectos de separar dicho tejido del tejido adjunto que contiene colágeno de Tipo I (membrana pericondrial) y también para extraer proteoglicanos del tejido resultante que contiene colágeno de Tipo II. Ambos métodos se utilizan como pretratamientos en un proceso para producir colágeno de Tipo II purificado. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos en los que el tejido que contiene colágeno de Tipo II se trata en primer lugar con una proteasa, tal como pepsina, para facilitar la eliminación del tejido que contiene colágeno de Tipo I y, a continuación, con otra proteasa, tal como tripsina, para eliminar proteoglicanos antes de la extracción del colágeno de Tipo II.

15 **Antecedentes de la invención**

El colágeno es el constituyente principal de los cartílagos de mamíferos, aves y peces y otros tejidos conectivos. Se caracteriza por tener un contenido elevado de glicina, prolina e hidroxiprolina. Estructuralmente, todas las moléculas de colágeno contienen un dominio helicoidal de triple cadena que comprende la secuencia de aminoácidos de repetición, Gly-X-Y, en la que la prolina se encuentra frecuentemente en la posición X y la 4-hidroxiprolina en la posición Y. La hélice está compuesta de tres polipéptidos denominados cadenas α , cada una con aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud para colágenos formadores de fibrilas, Tipos I-III, V y XI. Estas cadenas se enrollan entre sí para formar una estructura superhelicoidal de aproximadamente 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro (Petruska, JA y Hodge, AJ, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 51: 871, 1964).

Hasta la fecha, se han identificado 19 colágenos diferentes, cada uno de los cuales es codificado por un gen diferente (Prockop, DJ y Kivirikko, KI, Ann. Rev. Biochem., 64: 403-434, 1995). Estos colágenos se pueden dividir en diferentes clases dependiendo de su forma u otras características estructurales. De estos, los mejores caracterizados son los colágenos de Tipo I, Tipo II, Tipo III y Tipo IV. Los Tipos I, II y III son los tipos de colágeno principales hallados en tejidos conectivos (Miller, EJ, Collagen Types: Structure, Distribution and Functions (Tipos de Colágeno: Estructura, Distribución y Funciones), en Collagen (Colágeno), Volum I-Biochemistry (Volumen I-Bioquímica), Ed. ME Nimni, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, Capítulo 5, pág. 139-156). De estos tres, el colágeno de Tipo I es el más habitual. El colágeno de Tipo IV se encuentra exclusivamente ensamblado en una red de tipo lámina en las láminas basales, de las cuales constituye una parte principal. La preponderancia de colágeno de Tipo II se encuentra en estructuras cartilaginosas. También se encuentra en el humor vítreo del ojo.

La extracción de colágeno de Tipo II de tejidos de vertebrados (por ejemplo, cartílago) se facilita mediante la eliminación de proteoglicanos que están unidos al colágeno. Los proteoglicanos forman la "sustancia base" de todos los tejidos conectivos y son el sustrato en el que están incrustadas las fibras de tejido conectivo. En la técnica se han utilizado diversos procedimientos para la eliminación de proteoglicanos del cartílago antes de la extracción del colágeno, muchos de los cuales utilizan soluciones acuosas de sales inorgánicas y orgánicas. La purificación del colágeno de Tipo II a partir de extractos de colágeno implica en general precipitaciones diferenciales salinas para separar el colágeno de Tipo II del colágeno de Tipos I, IX y XI. Los colágenos de Tipos I y II coprecipitan en precipitaciones de sales ácidas y se pueden separar de los colágenos de Tipos IX y XI. Sin embargo, se necesitan precipitaciones de sales neutras para la separación eficaz de colágenos de Tipo II y Tipo I. La purificación del colágeno de Tipo II se realiza de manera mucho más fácil si se eliminan las membranas que contienen colágeno de Tipo I de origen esternal (u otro cartílago) antes de la extracción y purificación. Dicha separación se ha realizado en la técnica anterior mediante la extracción manual de la membrana (pericondrio) del origen cartilaginosa (Butler, WT y Reese, CA, Preparation of Type II Collagen (Preparación de Colágeno de Tipo II), En: Immunochimistry of the Extracellular Matrix (Inmunoquímica de la Matriz Extracelular), Volume I. Methods (Volumen I. Métodos), ED. H. Furthmayr, CRC Press, Boca Raton, FL, 1982, pág. 55-60). Este es un proceso laborioso y no práctico para una preparación a gran escala del colágeno de Tipo II. Además, dicha eliminación no es eficaz requiriendo etapas de procesado adicionales para asegurar que el colágeno de Tipo I es eliminado de la preparación más amplia que contiene colágeno de Tipo II, reduciendo en último lugar la producción del colágeno de Tipo II puro. Dichas etapas de procesado incluyen el uso de cloruro sódico en concentraciones de aproximadamente 2,5 M para precipitar de manera selectiva el colágeno de Tipo I a partir de soluciones de pH neutro y de aproximadamente 4,0 M para precipitar de manera selectiva el colágeno de Tipo II a partir de soluciones neutras. Se necesitan grandes cantidades de cloruro sódico sólido para estas precipitaciones seguidas de etapas de procesado adicionales. Los niveles residuales de colágeno de Tipo I en el producto de colágeno de Tipo II pueden variar de 0,5% a 5,0%. La presente invención da a conocer un método para una eliminación altamente eficaz de la membrana pericondrial que da lugar a una preparación final que contendrá habitualmente menos de un 1% de colágeno de Tipo I.

Los presentes inventores han descubierto un método de utilización de proteinasas ácidas, tales como pepsina, para digerir parcialmente y eliminar la mayoría del pericondrio y liberar el resto, de manera que una abrasión suave dará lugar a la eliminación esencialmente completa o completa de esta membrana de colágeno de Tipo I. La eliminación del pericondrio reduce el número de etapas de procesado requeridas para purificar el colágeno de Tipo II, simplificando de este modo la preparación de colágeno de Tipo II y reduciendo los costes de procesado. Habitualmente se han utilizado proteinasas ácidas para extraer colágeno de los tejidos pero no se han utilizado para separar de manera diferencial

ES 2 320 939 T3

un Tipo de colágeno de un segundo Tipo de colágeno. Dicha eliminación diferencial es particularmente aplicable a procesos de extracción de colágeno de Tipo II de tejidos cartilagosos, tales como tejido esternal, ya que el colágeno de Tipo II está "protegido" por proteoglicanos y, de este modo, no es digerido o extraído de manera significativa por el enzima durante este pretratamiento.

5

Una vez se ha extraído el pericondrio, el tejido cartilaginoso se puede pulverizar mecánicamente y tratar para eliminar los proteoglicanos. Los proteoglicanos se deben extraer antes de la posterior extracción del colágeno de Tipo II. En la técnica anterior, los proteoglicanos son extraídos generalmente utilizando sales inorgánicas u orgánicas. Las soluciones que contienen un haluro de metal alcalino, tal como cloruro sódico, cloruro potásico y cloruro de cesio en concentraciones de 1 a 5 molar (M), son capaces de extraer sólo un 15-20% del ácido hexurónico total presente inicialmente en el tejido (el ácido hexurónico residual, un componente de los proteoglicanos, se utiliza como una medición de la eficacia de extracción de proteoglicanos) (Mason, RM y Mayes, RW, *Biochem. Journal*, 131: 535-540, 1973). El bromuro de litio (4 M) y el cloruro de litio (6 M) son agentes de extracción de proteoglicanos más eficaces y pueden realizar la extracción del 70-80% de ácido hexurónico del cartílago. Sin embargo, las sales de litio son relativamente caras y su uso económicamente no es atractivo (especialmente en operaciones a gran escala). Además, se requieren grandes cantidades de sales de litio para la extracción y las soluciones que contienen litio deben eliminarse de manera adecuada para evitar un impacto medioambiental adverso.

También se ha observado que las soluciones acuosas de los haluros metálicos del Grupo II, tales como cloruro de magnesio, cloruro de calcio y cloruro de bario, son útiles para la extracción de proteoglicanos de tejidos que contienen colágeno. La extracción de cartílago ya sea con cloruro de magnesio (3 M) o cloruro cálcico (2 M) da lugar a una extracción de 60-70% del ácido hexurónico total de cartílago articular bovino (Mason, RM y Mayes, RW, *Biochemical Journal*, 131: 535-540, 1973). Los haluros orgánicos, tales como cloruro de guanidinio (3-5 M) y cloruro de S-metilisotiouranio, son más eficaces (80-85% de eliminación) en la extracción de proteoglicanos que el cloruro de magnesio o el cloruro cálcico (Mason, RM y Mayes, RW, *Biochemical Journal*, 131: 535-540, 1973). La eficacia de la extracción de proteoglicanos de tejidos que contienen colágeno de Tipo II depende de la composición de la solución de extracción (es decir, sal de haluro), así como del origen y la edad del tejido en tratamiento. La extracción de proteoglicanos de tejidos fetales y de recién nacidos es muy eficaz (hasta un 90%) en comparación con la extracción de tejidos adultos (habitualmente sólo de aproximadamente un 60%) (McNichol, D y Roughley, PJ, *Biochemical Journal*, 185: 705-713, 1980). La extracción de proteoglicanos del cartílago nasal, de crecimiento, laríngeo y traqueal (un máximo de un 85% de eliminación) es más eficaz que del cartílago articular y meniscal de la rodilla (habitualmente un 56-62%) (Stanescu, V., y otros, *Biochim. Biophys. Acta*, 629: 371-381, 1980). En la eficacia de la extracción también influye el método utilizado: un gran número de extracciones salinas con poca sal o pocas extracciones en concentraciones elevadas de sal. Algunos métodos adicionales para la extracción de proteoglicanos de tejidos citados en la técnica anterior son los siguientes:

Cremer y otros (*J. of Immunol.* 124: 2912 (1980)) dan a conocer la extracción de proteoglicanos como una etapa en la preparación de colágeno de Tipo II de tejido esternal de pollito en el que el esternón se trata con un tampón de fuerza iónica baja, tal como tampón de fosfato de potasio, para eliminar algunos proteoglicanos, seguido del tratamiento con pepsina a una proporción de enzima:tejido del 5% para extraer colágeno y las etapas de cromatografía posteriores para purificar el colágeno de Tipo II.

Steven y Thomas (*Biochem. J.*, 135: 245 (1973)) describen un método de preparación de colágeno insoluble a partir de cartílago mediante el tratamiento de cortes finos de cartílago humano con una solución de peróxido de hidrógeno durante 18 horas. A continuación, el cartílago tratado con peróxido de hidrógeno se lava extensamente con agua, se lava con una solución de cloruro sódico al 1% y se somete a digestión con tripsina en una proporción de enzima con respecto a tejido del 1%. La etapa del peróxido de hidrógeno se llevó a cabo para despolimerizar las cadenas laterales de glicosaminoglicanos de proteoglicanos antes de la degradación del núcleo de la proteína mediante tripsina.

Kempson y otros (*Biochim. Biophys. Acta*, 297: 456-472, 1973) describen métodos de liberación de ácido urónico en soluciones de incubación después del tratamiento de condilios femorales humanos con condroitinasa y con tripsina. La tripsina es eficaz en la liberación de hasta un 94% de ácido urónico de cartílago después de la incubación a 37°C durante 48 horas.

Otros (Heinegard y Hascall, *Arch. Biochem. Biophys.*, 165: 427-442, 1974 y Roughley y Barrett, *Biochemical Journal*, 167: 629-637, 1977) han demostrado que la tripsina es eficaz en la degradación de proteoglicanos extraídos de tejidos cartilagosos.

Trentham y otros (*J. of Exp. Med.*, 146: 857 (1977)) dan a conocer un método para preparar el colágeno de Tipo II de cartílago xifoides de pollo que comprende la digestión con pepsina en una proporción de enzima con respecto a tejido del 2% después de la extracción de proteoglicanos utilizando cloruro de magnesio 2 M, centrifugación del digesto y aplicación del sobrenadante a una columna de celulosa DEAE seguido de la elución del colágeno de Tipo II con un tampón Tris/NaCl.

Bayliss y otros (*Biochem. J.*, 169: 123 (1978)) dan a conocer la extracción de proteoglicanos a partir de un cartílago en concreto normal humano mediante el tratamiento del cartílago con cloruro de guanidinio (4 M) seguido de la separación del colágeno de los proteoglicanos del cartílago mediante centrifugación por densidad de CsCl.

ES 2 320 939 T3

Los métodos de extracción de proteoglicanos mencionados anteriormente dependen principalmente de la rotura mecánica del cartílago mediante la homogenización en soluciones de fuerza iónica baja o de la extracción química mediante soluciones concentradas de sales, tales como cloruro de magnesio, cloruro cálcico, o cloruro de guanidinio. Estos métodos extraen proteoglicanos a partir de cartílago, pero son relativamente ineficaces. Además, estos procedimientos requieren la utilización de grandes cantidades de sales seguido de un lavado extenso de residuos cartilaginosos empobrecidos en proteoglicanos para eliminar las sales residuales, lo cual incrementa el coste de dichos métodos debido al gasto implicado en la obtención y disposición de grandes cantidades de sales y al extenso procesado requerido para estas etapas adicionales. Otra desventaja de los métodos de la técnica anterior es la inconsistencia en la pureza de las preparaciones de colágeno de Tipo II fabricadas de cartílago tratado con sales de haluro.

Se ha descubierto que los presentes métodos para eliminar membranas pericondriales que contienen el Tipo I del cartílago que contiene el Tipo II y para separar proteoglicanos del colágeno de Tipo II tienen ventajas sorprendentes e inesperadas sobre los métodos de la técnica anterior, incluyendo, pero sin limitación, 1) rendimientos y pureza entre lotes consistentes del colágeno de Tipo II, 2) una eficacia de extracción de proteoglicanos de los tejidos que contienen colágeno de Tipo II sustancialmente superior; y 3) un mayor rendimiento de colágeno de Tipo II a partir de una cantidad determinada de material de partida (por ejemplo, esternón de pollo).

Tal como se utiliza en la presente invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados atribuidos:

Rendimiento de Colágeno de Tipo II: $\frac{\text{Cantidad de Colágeno de Tipo II en Producto}}{\text{Cantidad de Colágeno de Tipo II en el material de partida}} \times 100$

Pureza de Colágeno de Tipo II: $\frac{\text{Cantidad de Colágeno de Tipo II en Producto}}{\text{Cantidad total de producto}} \times 100$

Eficacia de la eliminación de proteoglicanos (PRE): $\frac{\text{Proteoglicano en material de partida-PG en producto}}{\text{Proteoglicano contenido en material de partida}} \times 100$

Objetivos de la invención

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un método eficaz para la extracción de membrana pericondrial que contiene colágeno de Tipo I a partir de esternón de pollo. También es un objetivo de la presente invención dar a conocer un método para la extracción eficaz de proteoglicanos de tejidos que contienen colágeno de Tipo II esencialmente libres de colágeno de Tipo I. En particular, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un método para la eliminación de proteoglicanos de tejido que contiene el colágeno de Tipo II que consigue, como mínimo, uno de los siguientes:

- (a) requiere cantidades pequeñas y baratas de agentes de extracción fácilmente desechables;
- (b) proporciona una separación fácil de los proteoglicanos del colágeno de Tipo II; y
- (c) da lugar a rendimientos elevados y consistentes de producto purificado.

Aún otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un proceso mejorado para obtener, a partir de tejidos animales, colágeno de Tipo II que está sustancialmente libre tanto de proteoglicanos como de material de colágeno de Tipo I.

Descripción resumida de la invención

Un aspecto primario de la presente invención está dirigido a un método mejorado para eliminar tejido que contiene colágeno de Tipo I adjunto al tejido animal que contiene colágeno de Tipo II, que comprende el tratamiento de tejido que contiene colágeno de Tipo II no procesado en una solución ácida en presencia de una proteínasa ácida, tal como pepsina, y someter la mezcla a una agitación moderada durante un periodo de tiempo suficiente para provocar la digestión o separación del tejido que contiene colágeno de Tipo I del tejido que contiene colágeno de Tipo II. Algunos ejemplos no limitantes de otras enzimas proteolíticas con actividad en condiciones ácidas incluyen renina (3.4.3) y catepsinas ácidas (B y D).

Además, se ha encontrado un método mejorado para extraer y eliminar proteoglicanos de tejidos que contienen colágeno de Tipo II esencialmente libres de colágeno de Tipo I mediante el tratamiento de tejidos fraccionados con una proteinasa neutra seguido de una centrifugación para separar los proteoglicanos solubles del colágeno de Tipo II insoluble. Se pueden utilizar una o más de una serie de proteasas para eliminar los proteoglicanos de los tejidos que contienen colágeno de Tipo II, incluyendo tripsina (3.4.4.4) (preferente), quimiotripsina A (3.4.4.5), quimiotripsina B (3.4.4.6), pancreatopeptidasa B (3.4.4.7), catepsina C (3.4.4.9), papaína (3.4.4.10); quimiopapaína (3.4.4.11) y ficina (3.4.4.12) (los números en paréntesis son los números de referencia de la Comisión de Enzimas).

En una realización preferente, la presente invención da a conocer un método para purificar colágeno de Tipo II a partir de tejido animal que comprende tejido que contiene colágeno de Tipo II y tejido que contiene colágeno de Tipo I adyacente, comprendiendo el método en primer lugar la eliminación del tejido que contiene colágeno de Tipo I, tal como se ha indicado anteriormente, seguido de la eliminación de proteoglicanos según el método indicado anteriormente.

15 Descripción detallada de la invención

La materia de la presente invención se caracteriza en las reivindicaciones.

Los tejidos a los que se aplica preferentemente el método de la presente invención son aquellos tejidos que contienen, como fibras estructurales, predominantemente colágeno de Tipo II, tal como cartílago esternal, de disco intervertebral, del notocordio, nasal, de crecimiento, laríngeo y traqueal, de vertebrados. Debido a que están ampliamente disponibles, se han utilizado tejidos de cartílago de pollo, lo más preferente en forma de esternón de pollo, obtenible de plantas donde se procesan pollos. Se prefiere que el tejido se mantenga a 4°C o inferior antes del procesamiento mediante el método de la presente invención. El tejido natural se recorta para eliminar cualquier carne o hueso. Cuando se utiliza esternón de pollo como tejido que contiene colágeno de Tipo II, se prefiere (y constituye un aspecto importante de la presente invención) eliminar la membrana pericondrial, que comprende ampliamente colágeno de Tipo I, antes de cualquier procesamiento adicional del tejido. Los tejidos más cartilaginosos están rodeados por una membrana pericondrial fibrosa. El cartílago articular parece ser una excepción (véase, RA Stockwell, *Biology of Cartilage Cells* (Biología de Células de Cartílago), Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 1979) y si el cartílago articular se utiliza como fuente de colágeno II, la etapa de extracción de cartílago de Tipo I se puede omitir. Naturalmente, es posible extraer membranas pericondriales utilizando un fórceps o bisturí tal como se muestra en la técnica anterior. Preferentemente, sin embargo, los esternones libres de carne y hueso no procesados se colocan en una solución ácida diluida (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, y similares) (pH 2,5 a 4,0) en presencia de una enzima proteolítica activa bajo condiciones ácidas, tales como pepsina, y se agitan suavemente durante aproximadamente 12 a 72 horas. Los esternones se puede guardar en la solución ácida durante varios días, pero la eliminación de membrana pericondrial es sustancialmente más sencilla si la pepsina se añade inmediatamente después de la inmersión de los esternones en la solución ácida. Se prefiere el ácido acético, ya que los tejidos colagenosos se hinchan en ácido acético en mayor grado que en ácido clorhídrico, y esto facilita la acción de la proteasa ácida.

En general, se prepara una solución de ácido orgánico diluida con una concentración de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 1,0 M y se añade pepsina de 100 mg/litro hasta 500 mg/litro. La solución ácida es preferentemente una solución de ácido acético en una concentración desde aproximadamente 0,25 hasta 0,75 M, preferentemente aproximadamente 0,5 M. La concentración habitual de pepsina en la solución ácida es de aproximadamente 200 hasta 500 mg por litro, preferentemente desde aproximadamente 300 hasta 400 mg por litro. La pepsina es una proteinasa ácida que hidroliza péptidos, incluyendo aquellos con enlaces adyacentes a residuos de aminoácidos aromáticos o dicarboxílicos. Para el tratamiento de una fuente de cartílagos (tal como esternón de pollo) para extraer las membranas de colágeno de Tipo I adherente, debe añadirse suficiente actividad de pepsina para digerir parcialmente, ablandar, y liberar la membrana de colágeno de Tipo I sin provocar la digestión y extracción de cantidades significativas de colágeno de Tipo II del tejido cartilaginoso. La suficiencia de la actividad de pepsina para eliminar la membrana de Tipo I se determina mediante inspección visual del tejido cartilaginoso. La digestión, ablandamiento y liberación de la membrana de Tipo I deben llevarse a cabo de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas.

Entre otras enzimas proteolíticas con actividad en condiciones ácidas que se pueden utilizar en lugar de o en una mezcla con pepsina se incluyen: renina (3.4.4.3) y catepsinas ácidas (B, D). Si se utiliza renina, una enzima con especificidad proteolítica similar a la pepsina, para eliminar las membranas que contienen colágeno de Tipo I, debería utilizarse en una concentración de aproximadamente 300 a 700 mg por litro, preferentemente aproximadamente 400 a 600 mg por litro. La catepsina D es una carboxiendoproteinasa que se ha purificado de bazo bovino y de conejo y demuestra una especificidad similar a la pepsina. La catepsina B es una tioendoproteinasa. Las concentraciones de catepsinas B y D requeridas para eliminar membranas pericondriales son mayores que las de pepsina y renina y el intervalo es de aproximadamente 400 a aproximadamente 1000 mg de catepsina (B o D) por litro. Los intervalos de concentración requeridos para las enzimas extractoras de colágeno de Tipo I dependen de su actividad y deben determinarse para cada tipo de enzima. Las determinaciones de la actividad enzimática son habituales para los expertos en la materia.

Durante el tratamiento con pepsina del tejido que contiene colágeno de Tipo II, la solución se puede mantener de aproximadamente 4°C a aproximadamente 28°C, pero preferentemente se mantiene aproximadamente a 20°C. El tejido debería agitarse durante el tratamiento con pepsina, comprendiendo preferentemente la agitación una agitación a una velocidad que mantiene el tejido que contiene colágeno de Tipo II suspendido en el líquido ácido. La velocidad de

ES 2 320 939 T3

agitación depende del volumen del recipiente de mezcla y de la cantidad de esternón añadido por unidad de volumen. Las membranas liberadas se enrollan alrededor de la vara de agitación y se extraen fácilmente de la vara. En un proceso habitual a escala piloto, se mezclan 300 esternones de pollo (aproximadamente 25 libras) con la mayor parte de la carne y el extremo óseo extraídos, en 60 litros de ácido orgánico diluido que contiene 400 mg de pepsina por litro de solución. Los esternones se dispersan en la solución utilizando un aparato mezclador, tal como un Mezclador Lightin, a aproximadamente 250-350 rpm o a una velocidad que permite la suspensión de los esternones en la solución y que permite la deposición estática de los esternones en el fondo del recipiente.

La membrana pericondrial habitualmente se liberará, se separará de los esternones, y se enrollará alrededor de los medios de agitación, de donde se puede eliminar fácilmente. Después del tratamiento para eliminar la membrana pericondrial, los esternones se lavan y se enjuagan con agua para extraer la membrana residual y liberar las partículas de membrana. Las piezas de membrana se identifican fácilmente y debería continuarse el lavado hasta lavar todas de dichas piezas del tejido intacto que contiene colágeno de Tipo II. Ocasionalmente, puede ser necesario arrastrar la membrana liberada utilizando, por ejemplo, medios mecánicos o colocar el tejido que contiene colágeno de Tipo II en un segundo sistema de mezclado que incorpora movimientos abrasivos suaves para extraer cualquier membrana pericondrial liberada, pero aún adherente, no extraída mediante el lavado y enjuagado con agua.

El tejido que contiene colágeno de Tipo II con la mayor parte o todo el pericondrio extraído se congela a continuación para facilitar la pulverización. Los esternones se pueden cortar en piezas más pequeñas antes de la congelación. El tejido congelado se introduce en el Pulverizador Micron Powder Systems Mikro-Bantam. Se pasa continuamente nitrógeno líquido en la cámara de molienda manteniendo la temperatura por debajo de -20°C. Los esternones se pulverizan en un polvo fino pasando a través de una malla de 0,062 pulgadas. Este polvo se puede guardar a aproximadamente -15°C. El tejido pulverizado se mezcla con un tampón que proporciona un pH en el intervalo de 7 a 9, preferentemente aproximadamente pH 8. El tampón es preferentemente tampón Tris. La cantidad de tejido pulverizado en la suspensión puede variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 gramos por litro, es preferentemente de aproximadamente 20 a 40 gramos por litro, y lo más preferente aproximadamente 25 gramos por litro. A la suspensión se añade una proteasa, preferentemente tripsina. Alternativamente (o en mezclas), entre otras proteasas neutras que se pueden utilizar se incluyen: quimi tripsina A, quimi tripsina B, pancreatopeptidasa B, catepsina C, papaína, quimiopapaína y ficina. La tripsina se solubiliza en el tampón y, a continuación, se añade hasta una concentración final de aproximadamente de 0,005 a 0,05%, preferentemente de aproximadamente 0,01 a 0,025%, y lo más preferente 0,02%. La concentración eficaz de tripsina depende de la actividad específica de la preparación enzimática. En general, la proporción de proteasa con respecto al peso de tejido pulverizado debería ser entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 5%, y debería ser preferentemente aproximadamente de 0,8%. Se pueden utilizar proporciones similares de enzima con respecto a peso de tejido cuando se utiliza papaína, quimi tripsina, pancreatopeptidasa, quimiopapaína, y ficina. Las cantidades exactas dependerán de la actividad de enzima específica de un lote determinado y el origen de la enzima y se pueden establecer fácilmente por los expertos en la materia mediante la determinación de la actividad específica por peso de enzima unitario y, a continuación, utilizando una cantidad de actividad enzimática aproximadamente equivalente a la actividad de tripsina descrita anteriormente.

Después de la adición de la proteasa, la suspensión se mezcla a la temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 35°C, preferentemente a aproximadamente 4°C, durante aproximadamente 8 a 36 horas, preferentemente aproximadamente 15 a 20 horas, y lo más preferente aproximadamente 17 horas. La tripsina es la enzima preferente, ya que está fácilmente disponible en una forma de pureza elevada y es relativamente económica.

Después de mezclarse, la suspensión se somete a centrifugación para separar las partículas no digeridas de las fases solubles. El sobrenadante se decanta y el residuo se resuspende y se lava con tampón, seguido de una segunda centrifugación. El sobrenadante se decanta de nuevo, produciendo un residuo que se puede digerir adicionalmente con otras enzimas y se purifica en un polvo que contiene habitualmente > 99% de colágeno de Tipo II. El análisis de la impureza de colágeno de tipo I se realiza mediante HPLC de fase inversa según métodos bien conocidos y es habitualmente inferior o igual al 1%. El nivel de contaminante de proteoglicanos es habitualmente inferior o igual al 1%.

Después de la extracción de proteoglicanos, el colágeno que contiene Tipo II se puede extraer adicionalmente y purificar utilizando métodos, tales como los descritos por Trentham, 1977, excepto que se han eliminado la cromatografía de intercambio aniónico y las etapas con sal elevada. Las enzimas residuales se pueden eliminar mediante lavado y/o diálisis o diafiltración. El producto que contiene colágeno de Tipo II anterior puede ser útil en el cultivo celular con propósitos de investigación o en la preparación de formulaciones farmacéuticas orales útiles en el tratamiento de artritis reumatoide tal como se describe por ejemplo en la Patente de Estados Unidos No. 5.399.347.

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración y no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplo 1

Extracción de colágeno de Tipo II de esternones de pollo congelados molidos de manera criogénica ("cryomilled")

Se obtuvieron esternones de pollo de una planta local de pechugas de pollo deshuesadas inspeccionada por USDA. Los esternones se mantuvieron en frío o congelados hasta el posterior procesado. Los esternones se recortaron para extraer cualquier carne o hueso y, a continuación, se colocaron en una solución de ácido acético 0,5 M a la que, a

ES 2 320 939 T3

continuaación, se añaadió pepsina a 400 mg por litro de solucióón. Los esternones se suspendieron en la solucióón ácida que contenía pepsina y se agitaron durante más de 2 días utilizando un conjunto de mezcladores Lightin a 280-350 rpm para eliminar y liberar la carne y membrana pericondrial residuales. Los esternones se lavaron, drenaron, examinaron y se extrajo cualquier resto de membrana pericondrial mediante rascado. Los esternones limpiados se congelaron posteriormente. Los esternones congelados se pulverizaron en un Pulverizador Micron Powder Systems Mikro Bantam™ en el que se introdujo nitrógeno líquido para mantener la temperatura por debajo de -20°C. El tamaño del polvo fue inferior a 0,062 pulgadas. Este polvo se puede guardar congelado a -15°C antes del procesado. Los esternones pulverizados se mezclaron con tampón Tris, pH 8,0, al que se había añaadido tripsina hasta una concentracióón de 0,02%. Esta suspensióón se mezcló a 4°C durante 17 horas. Los proteoglicanos, que se digirieron mediante tripsina, se extrajeron mediante centrifugacióón de la suspensióón, seguido del lavado del precipitado residual con 0,25 volúmenes de tampón, es decir, tampón Tris, pH 8,0, o agua desionizada, seguido de una segunda centrifugacióón. El precipitado resultante contenía colágeno de Tipo II en una forma insoluble no disuelta. Este precipitado fááilmente se puede digerir enzimáticamente para producir colágeno de Tipo II soluble que se puede purificar fááilmente hasta más de un 99% de pureza, a la cual es adecuado para el uso farmacéutico.

15 Ejemplo 2

Extracción de colágeno de Tipo II de esternones de pollo congelados molidos de manera criogénica (“cryomilled”)

20 Se obtuvieron esternones de pollo de una planta local de pechugas de pollo deshuesadas inspeccionada por USDA. Los esternones se mantuvieron en frío o congelados hasta el posterior procesado. Los esternones se recortaron para eliminar cualquier carne o hueso y, a continuaación, se colocaron en una solucióón de ácido clorhídrico 0,04 M a la que, a continuaación, se añaadió renina a 500 mg por litro de solucióón. Los esternones se suspendieron en la solucióón ácida que contiene renina y se agitaron durante más de 2 días utilizando un conjunto de mezcladores Lightin a 280-350 rpm para extraer y liberar la carne y membrana pericondrial residuales. Los esternones se lavaron, drenaron, examinaron y se extrajo cualquier resto de membrana pericondrial mediante rascado. Los esternones limpiados se congelaron posteriormente. Los esternones congelados se pulverizaron en un Pulverizador Micron Powder Systems Mikro Bantam™ en el que se introdujo nitrógeno líquido para mantener la temperatura por debajo de -20°C. El tamaño del polvo fue inferior a 0,062 pulgadas. Este polvo se puede guardar congelado a -15°C antes del procesado. 30 Los esternones pulverizados se mezclaron con tampón Tris, pH 8,0, al que se añaadió papaína hasta una concentracióón de 0,04%. Esta suspensióón se mezcló a 4°C durante 17 horas. Los proteoglicanos, que se digieren mediante tripsina, se extrajeron mediante centrifugacióón de la suspensióón, seguido del lavado del precipitado residual con 0,25 volúmenes de tampón, es decir, tampón Tris, pH 8,0, o agua desionizada, seguido de una segunda centrifugacióón. El precipitado resultante contenía colágeno de Tipo II en una forma insoluble no disuelta. Este precipitado fááilmente se puede digerir 35 enzimáticamente para producir colágeno de Tipo II soluble que se puede purificar fááilmente hasta más de un 99% de pureza, a la cual es adecuado para el uso farmacéutico.

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 939 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para obtener un producto que contiene colágeno de Tipo II esencialmente libre de colágeno de Tipo I y otras impurezas a partir de un tejido sin carne ni hueso de origen vertebrado o de cartílago de vertebrado no procesado que comprende colágeno de Tipo II, proteoglicanos y una membrana pericondrial que contiene colágeno de Tipo I, comprendiendo el método:
- 10 a) poner en contacto dicho tejido bajo agitación con una solución ácida que contiene una proteasa ácida durante un periodo de tiempo suficiente para digerir o liberar dicha membrana, y recuperar dicho tejido esencialmente libre de colágeno de tipo I; y
- 15 b) a continuación, poner en contacto dicho tejido bajo agitación con una solución a pH aproximadamente neutro, conteniendo dicha solución una proteasa neutra en una proporción en peso de proteasa:tejido en el intervalo de 0,05%-5% durante un periodo de tiempo suficiente para que la proteasa separe los proteoglicanos contenidos en dicho tejido, y recuperar dicho tejido esencialmente libre tanto de colágeno de Tipo I como de proteoglicanos.
- 20 2. Método, según la reivindicación 1, en el que el origen de dicho cartílago es esternón de pollo.
3. Método, según la reivindicación 2, en el que dicha proteasa ácida es pepsina.
4. Método, según la reivindicación 3, en el que la concentración de dicha pepsina es de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg por litro de dicha solución ácida.
- 25 5. Método, según la reivindicación 4, en el que el agente acidificante de dicha solución ácida es ácido acético 0,5 M.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que dicho tratamiento dura de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 horas.
- 30 7. Método, según la reivindicación 5, en el que dicho tratamiento dura de aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas.
8. Método, según la reivindicación 6, en el que dicho tratamiento tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C.
- 35 9. Método, según la reivindicación 6, en el que dicho tratamiento tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 20°C.
- 40 10. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho tejido en la etapa b) es cartílago pulverizado del cual se ha eliminado la membrana pericondrial antes de la pulverización.
11. Método, según la reivindicación 10, en el que el origen de dicho cartílago es esternón de pollo.
- 45 12. Método, según la reivindicación 10, en el que dicha proteasa neutra se selecciona del grupo que consiste en quimi tripsina, pancreatina, papaína, ficina, quimiopapaína, pancreatopeptidasa, y tripsina, y dicha proteasa está presente en una proporción en peso de proteasa con respecto a tejido de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%.
- 50 13. Método, según la reivindicación 12, en el que dicha proteasa es tripsina, y dicha tripsina está presente en una proporción en peso de proteasa con respecto a tejido de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%.
14. Método, según la reivindicación 13, en el que dicha tripsina está presente en una concentración de aproximadamente 0,8%.
- 55 15. Método, según la reivindicación 12, en el que dicho periodo de tiempo es de aproximadamente 8 a aproximadamente 36 horas.
16. Método, según la reivindicación 15, en el que dicho periodo de tiempo es de aproximadamente 15 a 20 horas.
- 60 17. Método, según la reivindicación 10, en el que dicho contacto en la etapa b) tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 35°C.
- 65 18. Método, según la reivindicación 17, en el que dicho contacto tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 4°C.