

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 881**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2007 E 18209918 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3508571**

54 Título: **Composiciones adecuadas para el tratamiento de enfermedades mediadas por colágeno**

30 Prioridad:

30.01.2006 US 76347006 P

20.03.2006 US 78413506 P

29.01.2007 US 69930207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2024

73 Titular/es:

ENDO BIOLOGICS LIMITED (100.0%)
First Floor, Minerva House Simmons Court Road
Ballsbridge, Dublin 4, IE

72 Inventor/es:

SABATINO, GREGORY, L.;
DEL TITO, JR., BENJAMIN J.;
BASSETT, PHILLIP, J.;
THARIA, HAZEL, A.;
HITCHCOCK, ANTONY, G.;
YU, BO y
WEGMAN, THOMAS, L.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 992 881 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

Composiciones adecuadas para el tratamiento de enfermedades mediadas por colágeno

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El colágeno es el principal componente estructural de los organismos mamíferos y constituye una gran parte del contenido total de proteínas de la piel y otras partes del cuerpo del animal. En los seres humanos, es particularmente importante en el proceso de curación de heridas y en el proceso de envejecimiento natural. Diversos traumas de la piel, tales como quemaduras, cirugía, infección y accidente, a menudo se caracterizan por la acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno y que tiene un mayor contenido de proteoglicanos. Además del reemplazo del tejido normal que se ha dañado o destruido, a veces se forman depósitos excesivos y desfigurantes de tejido nuevo durante el proceso de curación. El exceso de deposición de colágeno se ha atribuido a una alteración en el equilibrio entre la síntesis del colágeno y la degradación del colágeno.

Numerosas enfermedades y afecciones están asociadas con el exceso de deposición de colágeno y la acumulación errática de tejido fibroso rico en colágeno. Dichas enfermedades y afecciones se denominan colectivamente aquí "enfermedades mediadas por colágeno". La colagenasa se ha utilizado para tratar una variedad de enfermedades mediadas por colágeno. La colagenasa es una enzima que tiene la capacidad específica para digerir el colágeno.

La colagenasa para uso en terapia se puede obtener de una variedad de fuentes que incluyen mamíferos (por ejemplo, seres humanos), crustáceos (por ejemplo, cangrejo, gamba), hongos y bacterias (por ejemplo, de la fermentación de *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, o *Vibrio*). La colagenasa también se ha diseñado genéticamente mediante ingeniería. Una fuente común de colagenasa bruta proviene de un proceso de fermentación bacteriana, específicamente la fermentación de *C. histolyticum* (*C. his*). La colagenasa bruta obtenida de *C. his* puede purificarse utilizando cualquiera de una variedad de técnicas cromatográficas.

Un inconveniente del proceso de fermentación de *C. his* es que produce relaciones inciertas de las diversas colagenasas, tales como colagenasa I y colagenasa II, que se utilizan a menudo en composiciones terapéuticas para tratar afecciones mediadas por colágeno. Además, el cultivo ha requerido históricamente el uso de productos cárnicos. Este cultivo de carne derivó originalmente de la cepa H4 de *Clostridium histolyticum*, Laboratorio del Dr. I. Mandl en la Universidad de Columbia en 1956, y se depositó en la ATCC. Los viales liofilizados se obtuvieron con el cultivo de carne cocida, y se denominaron banco de células maestras ABC de *Clostridium histolyticum*.

Diversas relaciones de colagenasa I a colagenasa II en una preparación terapéutica de colagenasa tienen diferentes efectos biológicos. Por lo tanto, sería deseable una preparación terapéutica de colagenasa en la que la relación de colagenasa I a colagenasa II en la preparación pueda determinarse y controlarse fácil y eficazmente para obtener una actividad enzimática y un efecto terapéutico superiores y consistentes.

El documento WO 98/24889 describe composiciones que comprenden colagenasa I, colagenasa II y una endoproteasa. Las composiciones son para la disociación enzimática de matrices de tejido extracelular para permitir la remodelación del tejido y el aislamiento eficaz de células viables y grupos de células del tejido.

El documento US 2004/0137596 describe un método para purificar al menos una enzima obtenida en una fermentación en exceso de *Clostridium histolyticum*. Se describe la colagenasa de tipo II que tiene una pureza del 82%, y la colagenasa de tipo I que tiene una pureza del 85%.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una sustancia farmacéutica, que comprende como únicos ingredientes activos colagenasa I y colagenasa II de *Clostridium histolyticum* aisladas y purificadas presentes en una relación molar de alrededor de 1: 1, en la que tanto la colagenasa I como la colagenasa II son al menos 95% por área pura según se determina por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa. Cuando se utiliza como una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades mediadas por colágeno, la composición de la invención proporciona un efecto terapéutico mejorado y consistente a la vez que reduce el potencial de efectos secundarios.

La invención proporciona además la sustancia farmacéutica de la invención para su uso en medicina.

La invención proporciona un proceso para producir una sustancia farmacéutica según la invención, que comprende las etapas de:

a) fermentar la *Clostridium histolyticum*;

b) cosechar una fermentación bruta que comprende colagenasa I y colagenasa II;

c) purificar la colagenasa I y la colagenasa II de la cosecha bruta mediante filtración y cromatografía en columna; y

5 d) combinar la colagenasa I y la colagenasa II purificadas de la etapa (c) en una relación de alrededor de 1 a 1, en el que la etapa de purificación comprende las etapas de:

i) filtrar la cosecha bruta a través de un filtro de intercambio aniónico;

10 ii) añadir sulfato de amonio;

iii) filtrar la cosecha bruta;

iv) hacer pasar la cosecha a través de una columna HIC;

15 v) añadir leupeptina al filtrado;

vi) eliminar el sulfato de amonio y mantener la leupeptina para una correcta unión de colagenasa I y colagenasa II con intercambio de amortiguador por TFF;

20 vii) filtrar la mezcla de la etapa (vi); y

viii) separar la colagenasa I y la colagenasa II utilizando cromatografía de intercambio aniónico;

25 ix) preparar la concentración y formulación de TFF para colagenasa I y colagenasa II por separado; y

x) filtrar a través de un sistema de filtración de 0,2 µm.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Los objetos anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos, en los que caracteres con la misma referencia se refieren a las mismas partes a lo largo de las diversas vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala; en su lugar, se pone énfasis en ilustrar los principios de la invención.

35 La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento (DO frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones de 5 l de DCFT24a,b.

40 La Figura 2 muestra las curvas de crecimiento neto (DO neta frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones de 5 l de DCFT24a,b.

La Figura 3 es un gel de SDS PAGE de Tris-glicina al 8% de la segunda fermentación:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Colagenasa I - 0,27 µg
Carril 3:	Colagenasa II - 0,29 µg
Carril 4:	20 h (6,12 µl de muestra) - Momento de cosecha
Carril 5:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 6:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	16 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	15 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	14 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	13 h (6,12 µl de muestra)
Carril 11:	11,6 h - 19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 12:	10,5 h (6,12 µl de muestra);

45 La Figura 4 es un gel de SDS PAGE de Tris-glicina al 8% de la primera fermentación:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Colagenasa I - 0,27 µg
Carril 3:	Colagenasa II - 0,29 µg
Carril 4:	20 h (6,12 µl de muestra) - Momento de cosecha
Carril 5:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 6:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	16 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	15 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	14 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	13 h (6,12 µl de muestra)
Carril 11:	11,4 h (6,12 µl de muestra)
Carril 12:	10,4 h (6,12 µl de muestra);

La Figura 5 es un gel de SDS PAGE semicuantitativa para la segunda fermentación, muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de fermentación)
Carril 3:	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de fermentación)
Carril 4:	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de fermentación)
Carril 5:	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de fermentación)
Carril 6:	0,27µg de colagenasa I
Carril 7:	0,18µg de colagenasa I
Carril 8:	0,135µg de colagenasa I
Carril 9:	0,29µg de colagenasa II
Carril 10:	0,193µg de colagenasa II
Carril 11:	0,145µg de colagenasa II;

5

La Figura 6 representa la estrategia de fermentación usada para DCFT26a y DCFT26b;

La Figura 7 representa las curvas de crecimiento (DO frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones de 5 l de DCFT26a,b;

10

La Figura 8 representa curvas de crecimiento neto (DO neta frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones de 5 l de DCFT26a,b;

La Figura 9 es un gel de SDS PAGE para DCFT26a:

15

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Colagenasa I - 0,67 µg
Carril 3:	Colagenasa II - 0,72 µg
Carril 4:	20 h (6,12 µl de muestra) - Momento de cosecha
Carril 5:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 6:	18 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	16 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	14 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	13 h (6,12 µl de muestra)
Carril 11:	11 h (6,12 µl de muestra);

La Figura 10 es un gel de SDS PAGE para DCFT26b:

ES 2 992 881 T3

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	20 h (6,12 µl de muestra) - Momento de cosecha
Carril 3:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 4:	18 h (6,12 µl de muestra)
Carril 5:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 6:	16 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	15 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	14 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	13 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	11 h (6,12 µl de muestra)
Carril 11:	Colagenasa I - 0,67 µg
Carril 12:	Colagenasa II - 0,72 µg

La Figura 11 es un gel de SDS PAGE semicuantitativo para DCFT26a, muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27µg de colagenasa I
Carril 3:	0,18µg de colagenasa I
Carril 4:	0,135µg de colagenasa I
Carril 5:	0,29µg de colagenasa II
Carril 6:	0,193µg de colagenasa II
Carril 7:	0,145µg de colagenasa II
Carril 8:	0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de fermentación)
Carril 9:	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de fermentación)
Carril 10:	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de fermentación)
Carril 11:	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de fermentación);

5

La Figura 12 es un gel de SDS PAGE semicuantitativo para DCFT26b, muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27µg de colagenasa I
Carril 3:	0,18µg de colagenasa I
Carril 4:	0,135µg de colagenasa I
Carril 5:	0,29µg de colagenasa II
Carril 6:	0,193µg de colagenasa II
Carril 7:	0,145µg de colagenasa II
Carril 8:	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de fermentación)
Carril 9:	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de fermentación)
Carril 10:	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de fermentación)
Carril 11:	0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de fermentación);

La Figura 13 es un gel de SDS PAGE para muestras precipitadas con sulfato de amonio postdializadas (100 g/l y 150 g/l), DCFT26a, muestra del momento de cosecha:

10

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,67 µg de colagenasa I y 0,72 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 4:	6,12µL de muestra de sobrenadante de SC11

ES 2 992 881 T3

Carril 5:	muestra postdializada - 100 g/l de AS (pura)
Carril 6:	Muestra postdializada - 100 g/l de AS (1/5)
Carril 7:	Muestra postdializada - 100 g/l de AS (1/10)
Carril 8:	muestra postdializada - 150 g/l de AS (pura)
Carril 9:	muestra postdializada - 150 g/l de AS (1/5)
Carril 10:	muestra postdializada - 150 g/l de AS (1/10);

La Figura 14 es un gel de SDS PAGE para muestras precipitadas con sulfato de amonio postdializadas (200 g/l y 250 g/l), DCFT26a, momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,67 µg de colagenasa I y 0,72 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 4:	6,12µL de muestra de sobrenadante de SC11
Carril 5:	muestra postdializada - 200 g/l de AS (pura)
Carril 6:	muestra postdializada - 200 g/l de AS (1/5)
Carril 7:	muestra postdializada - 200 g/l de AS (1/10)
Carril 8:	muestra postdializada - 250 g/l de AS (pura)
Carril 9:	muestra postdializada - 250 g/l de AS (1/5)
Carril 10:	muestra postdializada - 250 g/l de AS (1/10);

5

La Figura 15 es un gel de SDS PAGE para muestras precipitadas con sulfato de amonio postdializadas (300 g/l y 400 g/l), DCFT26a, momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,67 µg de colagenasa I y 0,72 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 4:	6,12µL de muestra de sobrenadante de SC11
Carril 5:	muestra postdializada - 300 g/l de AS (muestra pura)
Carril 6:	muestra postdializada - 300 g/l de AS (dilución 1/5)
Carril 7:	muestra postdializada - 300 g/l de AS (1/10)
Carril 8:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (pura)
Carril 9:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/5)
Carril 10:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/10);

10 La Figura 16 representa curvas de crecimiento (DO frente al tiempo, y DO neta frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentación de PBFT57;

La Figura 17 es un gel de SDS PAGE semicuantitativo, muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27µg de colagenasa I
Carril 3:	0,18µg de colagenasa I
Carril 4:	0,135µg de colagenasa I
Carril 5:	0,29µg de colagenasa II
Carril 6:	0,193µg de colagenasa II
Carril 7:	0,145µg de colagenasa II
Carril 8:	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de cosecha de fermentación)
Carril 9:	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de cosecha de fermentación)
Carril 10:	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de cosecha de fermentación)

ES 2 992 881 T3

Carril 11: 0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de cosecha de fermentación);

La Figura 18a es un gel de SDS PAGE cuantitativo para una muestra de 500 ml postdializada de PBFT57 de fermentación, muestra del momento de cosecha. 400 g/l de sulfato de amonio añadido:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,272 µg de colagenasa I y 0,286 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,181 µg de colagenasa I y 0,190 µg de colagenasa II
Carril 4:	0,136 µg de colagenasa I y 0,142 µg de colagenasa II
Carril 5:	0,109 µg de colagenasa I y 0,114 µg de colagenasa II
Carril 6:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/15)
Carril 7:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/20)
Carril 8:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/25)
Carril 9:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/30)
Carril 10:	muestra postdializada - 400 g/l de AS (dilución 1/35)
Carril 11:	Marcador de alto peso molecular;

5

La Figura 18b es una SDS PAGE de los sobrenadantes después de la centrifugación de las muestras precipitadas con sulfato de amonio:

Carril 1: Carril 2:	Marcador de alto peso molecular 0,27 µg de Col I y 0,29 µg de Col II
Carril 3:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (adición lenta de 400 g/l)
Carril 4:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (adición rápida de 400 g/l)
Carril 5:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (adición lenta de 440 g/l)
Carril 6:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (adición lenta de 480 g/l)
Carril 7:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (adición lenta de 520 g/l)
Carril 8:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (400 g/l, pH 6)
Carril 9:	Sobrenadante (puro) de muestra precipitada con sulfato amónico post-dializada (400 g/l, oxigenada);

10 La Figura 19 es un gel de SDS PAGE semicuantitativa que muestra muestras diluidas del sobrenadante del momento de cosecha y la muestra precipitada de sulfato de amonio postdializada (con 400 g/l - adición rápida):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Muestra de fermentación - cosecha (pura)
Carril 3:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/1)
Carril 4:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/2)
Carril 5:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/3)
Carril 6:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/4)
Carril 7:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/17,54) corresponde al carril 1
Carril 8:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/35,08) corresponde al carril 2
Carril 9:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/52,62) corresponde al carril 3
Carril 10:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/70,16) corresponde al carril 4
Carril 11:	Muestra post dializada - cosecha (dilución 1/87,70) corresponde al carril 5;

ES 2 992 881 T3

La Figura 20 es un gel de SDS PAGE semicuantitativo para PBFT57 que muestra muestras diluidas del sobrenadante del momento de cosecha y la muestra precipitada de sulfato de amonio postdializada (con 520 g/l):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Muestra de fermentación - cosecha (pura)
Carril 3:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/1)
Carril 4:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/2)
Carril 5:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/3)
Carril 6:	Muestra de fermentación - cosecha (dilución 1/4)
Carril 7:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/15,63) corresponde al carril 1
Carril 8:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/31,26) corresponde al carril 2
Carril 9:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/46,89) corresponde al carril 3
Carril 10:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/62,52) corresponde al carril 4
Carril 11:	Muestra postdializada - cosecha (dilución 1/78,15) corresponde al carril 5;

- 5 La Figura 21 muestra las curvas de crecimiento (DO neta frente al tiempo) de las cepas 004 y 013 de *C. histolyticum* en fermentaciones de PBFT58c,d;

La Figura 22 es un gel de SDS PAGE para PBFT58c (Cepa 004):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Colagenasa I - 1,00 µg
Carril 3:	Colagenasa I - 0,67 µg
Carril 4:	Colagenasa II - 1,08 µg
Carril 5:	Colagenasa II - 0,72 µg
Carril 6:	16,25 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	18 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	20,5 h (6,12 µl de muestra);

10

La Figura 23 es un gel de SDS PAGE para PBFT58d (Cepa 013):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	Colagenasa I - 1,00 µg
Carril 3:	Colagenasa I - 0,67 µg
Carril 4:	Colagenasa II - 1,08 µg
Carril 5:	Colagenasa II - 0,72 µg
Carril 6:	16,25 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	18 h (6,12 µl de muestra)
Carril 9:	19 h (6,12 µl de muestra)
Carril 10:	20,5 h (6,12 µl de muestra);

- 15 La Figura 24 es un gel de SDS PAGE semicuantitativa para PBFT58c (cepa 004), muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,18 µg de colagenasa I y 0,19 µg de colagenasa II

ES 2 992 881 T3

Carril 4:	0,135 µg de colagenasa I y 0,145 µg de colagenasa II
Carril 5:	0,108 µg de colagenasa I y 0,116 µg de colagenasa II
Carril 6:	6,12 µl de muestra
Carril 7:	3,06 µl de muestra
Carril 8:	2,04 µl de muestra
Carril 9:	1,53 µl de muestra
Carril 10:	1,22 µl de muestra;

La Figura 25 es un gel de SDS PAGE semicuantitativa para PBFT58d (cepa 013), muestra del momento de cosecha:

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,18 µg de colagenasa I y 0,19 µg de colagenasa II
Carril 4:	0,135 µg de colagenasa I y 0,145 µg de colagenasa II
Carril 5:	0,108 µg de colagenasa I y 0,116 µg de colagenasa II
Carril 6:	6,12 µl de muestra
Carril 7:	3,06 µl de muestra
Carril 8:	2,04 µl de muestra
Carril 9:	1,53 µl de muestra
Carril 10:	1,22 µl de muestra;

5

La Figura 26 es gel de SDS PAGE para muestra del momento de cosecha postdializada (520 g/l de sulfato de amonio) de fermentación de PBFT58c (cepa 004):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,18 µg de colagenasa I y 0,19 µg de colagenasa II
Carril 4:	0,135 µg de colagenasa I y 0,145 µg de colagenasa II
Carril 5:	0,108 µg de colagenasa I y 0,116 µg de colagenasa II
Carril 6:	muestra del momento de cosecha postdializada - Pura
Carril 7:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/5)
Carril 8:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/10)
Carril 9:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/15)
Carril 10:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/20);

10 La Figura 27 es gel de SDS PAGE para muestra del momento de cosecha postdializada (400 g/l de sulfato de amonio) de fermentación de PBFT58d (cepa 013):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II
Carril 3:	0,18 µg de colagenasa I y 0,19 µg de colagenasa II
Carril 4:	0,135 µg de colagenasa I y 0,145 µg de colagenasa II
Carril 5:	0,108 µg de colagenasa I y 0,116 µg de colagenasa II
Carril 6:	muestra del momento de cosecha postdializada - Pura
Carril 7:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/5)
Carril 8:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/10)
Carril 9:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/15)
Carril 10:	muestra del momento de cosecha postdializada - (dilución 1/20);

La Figura 28 ilustra un diagrama de flujo del procedimiento experimental usado para cribar las peptonas vegetales alternativas;

5 La Figura 29 ilustra una estrategia de alimentación discontinua para fermentaciones de DCFT27a,b;

La Figura 30 representa curvas de crecimiento (DO neta frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones alimentadas discontinuas de 5 l de DCFT27a y DCFT27b;

10 La Figura 31 muestra curvas de crecimiento neto (DO neta frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones discontinuas de 5 l de PBFT59a,b,c.

La Figura 32 muestra una curva de crecimiento (DO frente al tiempo) de *C. histolyticum* en fermentaciones alimentadas discontinuas de 5 l de DCFT27d.

15 La Figura 33a es un gel de SDS PAGE para DCFT27d (Fitona suplementado con aminoácidos):

Carril 1:	Marcador de alto peso molecular
Carril 2:	18 h (6,12 µl de muestra)
Carril 3:	17 h (6,12 µl de muestra)
Carril 4:	15 h (6,12 µl de muestra)
Carril 5:	14 h (6,12 µl de muestra)
Carril 6:	13 h (6,12 µl de muestra)
Carril 7:	11,3 h (6,12 µl de muestra)
Carril 8:	0,27 µg de colagenasa I y 0,29 µg de colagenasa II;

La Figura 33b muestra un diagrama esquemático del procedimiento de inoculación;

20 La Figura 33c representa un diagrama de flujo de un proceso de inoculación alimentado discontinuo de aproximadamente 200 l;

La Figura 34 muestra un cromatograma después de la cromatografía con hidroxapatita;

25 La Figura 35 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico en fractogel TMAE.

La Figura 36 es un análisis de SDS-PAGE con Tris-Glicina al 8% del material Pre HA, Post HA y Post TMAE del proceso a escala de 5 l:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de alto peso molecular	20
2	1 µg de referencia de colagenasa ABC I	20
3	1 µg de referencia de colagenasa ABC II	20
4	Pre HA- 1µg	20
5	Post HA - 1µg	20
6	Post TMAE - 1µg	20

La Figura 37 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico en fractogel TMAE.

35 La Figura 38 es un análisis de SDS-PAGE con Tris-Glicina al 8% de cromatografía en Q Sepharose IEX de material post TMAE realizado en presencia de leupeptina:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de alto peso molecular	20
2	1 µg de referencia de colagenasa ABC I	20
3	1 µg de referencia de colagenasa ABC II	20
4	Post TMAE/Post Diálisis - 1 µg	20

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
5	Fracción D6 - Pura	20
6	Fracción E6 - Pura	20
7	Fracción F7 - 1 μ g	20
8	Fracción F6 - 1 μ g	20
9	Fracción F5 - 1 μ g	20
10	Fracción F4 - Pura	20;

La Figura 39 es un análisis de SDS-PAGE con Tris-Glicina al 8% de cromatografía en Q Sepharose IEX de material post TMAE realizado en presencia de leupeptina. Gel 2- Pico 2 (ABCI):

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l	Volumen de carga, μ l
1	Marcador de alto peso molecular	20	
2	1 μ g de referencia de colagenasa ABC I	20	
3	1 μ g de referencia de colagenasa ABC II	20	
4	Fracción B2 - Pura	20	
5	Fracción C1 - 1 μ g	20	
6	Fracción C2 - 1 μ g	20	
7	Fracción C3 - 1 μ g	20	
8	Fracción C4 - 1 μ g	20	
9	Fracción C5 - Pura	20	
10	Fracción C6 - Pura	20;	

5 La Figura 40 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico en Q Sepharose HP con gradiente modificado;

10 La Figura 41 muestra un cromatograma después de una cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCII;

La Figura 42 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 12% de GPC Superdex 75 de ABC II concentrada realizado en presencia de arginina:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marca 12 marcador	10
2	1 μ g de referencia de colagenasa ABC I	15
3	1 μ g de referencia de colagenasa ABC II	15
4	Carga de GPC 1 μ g	15
5	Fracción D4	15
6	Fracción D3	15
7	Fracción D2	15
8	Fracción D1	Pura 15
9	Fracción E1	15
10	Fracción E2	15
11	Fracción E3	15
12	Fracción E4	15;

15 La Figura 43 muestra un cromatograma después de una cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCI;

20 La Figura 44 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de GPC Superdex 75 de ABC I concentrada realizado en presencia de arginina:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marca 12 marcador	10
2	1 μ g de referencia de colagenasa ABC I	15
3	1 μ g de referencia de colagenasa ABC II	15
4	Carga de GPC 1 μ g	15
5	Fracción D4	15
6	Fracción D3	15
7	Fracción D2	15
8	Fracción D1	15
9	Fracción E1	15
10	Fracción E2	15
11	Fracción E3	15
12	Fracción E4	15

La Figura 45 representa un diagrama de flujo de un proceso de fabricación propuesto;

La Figura 46 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de fermentación para el proceso 3.

5

La Figura 47 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de purificación para el proceso 3.

La Figura 48 es una SDS-PAGE (reducida) teñida con Coomassie para los Intermedios AUXI y AUXII:

10 Carril

1	Marcadores de alto peso molecular
2	0,132 mg/ml de referencia ABC-I
3	0,0265 mg/ml de referencia ABC-I
4	0,132 m/ml de intermedio AUX-I
5	0,0265 m/ml de intermedio AUX-I
6	0,132 mg/ml de referencia ABC-II
7	0,0265 mg/ml de referencia ABC-II
8	0,132 mg/ml de intermedio AUX-II
9	0,0265 mg/ml de intermedio AUX-II

La Figura 49 es una SDS-PAGE (reducida) con tinción de Coomasie para la sustancia farmacéutica:

15 Carril

1	Marcadores de alto peso molecular
2	0,132 mg/ml de referencia BTC mixta
3	0,0265 mg/ml de referencia BTC mixta
4	0,132 mg/ml de sustancia farmacéutica
5	0,0265 mg/ml de sustancia farmacéutica;

La Figura 50 es una SDS-PAGE (reducida) con tinción de Plata para la sustancia farmacéutica:

20 Carril

1	Marcador de HMW
2	Referencia BTC mixta 1,3 μ g
3	Blanco
4	Sustancia farmacéutica 1,3 μ g.

5	Sustancia farmacéutica 0,27 µg.
6	Sustancia farmacéutica 0,13 µg.

La Figura 51 muestra una comparación de *C. histolyticum* cultivada en Proteosa Peptona #3 en un proceso de fermentación discontinuo con el proceso de fermentación existente que usa Fitona Peptona durante el cultivo alimentado discontinuo;

5

—●— lote GCFT03b PP3 —◆— alimentada discontinua con GCFT03d Fitona

La Figura 52 es un análisis de SDS-PAGE del producto de colagenasa en el momento de cosecha (20h) de una fermentación discontinua de 5 l de Proteosa Peptona #3 (GCFT03b) (Tris-Glicina al 8%):

10

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	0,27 µg AUXI
3	0,18 µg AUXI
4	0,135 µg AUXI
5	0,29 µg AUXII
6	0,193 µg AUXII
7	0,145 µg AUXII
8	0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de fermentación)
9	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de fermentación)
10	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de fermentación)
11	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de fermentación)

Estimación

AUXI ~ 176 mg/l

AUXII ~ 190 mg/l

La Figura 53 es un análisis de SDS-PAGE del producto de colagenasa en el momento de cosecha (20h) de una fermentación alimentada discontinua de 5 l con Fitona (GCFT03d) (Tris-Glicina al 8%):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	0,27 µg AUXI
3	0,18 µg AUXI
4	0,135 µg AUXI
5	0,29 µg AUXII
6	0,193 µg AUXII
7	0,143 µg AUXII
8	0,87 µl de muestra (dilución 1/7 de muestra de fermentación)
9	1,22 µl de muestra (dilución 1/5 de muestra de fermentación)
10	1,53 µl de muestra (dilución 1/4 de muestra de fermentación)
11	2,04 µl de muestra (dilución 1/3 de muestra de fermentación)

Estimación

AUXI ~ 88 mg/l

AUXII ~ 142 mg/l

15

La Figura 54 ilustra tres fermentaciones de *Clostridium histolyticum* que se hace crecer en 50 g/l de PP3 que demuestran un perfil de crecimiento reproducible:

20

—●— GCFT03b —◆— GCFT03d
—★— GCFT03d

25

La Figura 55 es un análisis de SDS-PAGE que muestra el curso temporal de GCFT05d (fermentación discontinua con Proteosa Peptona #3), gel de Tris-glicina al 8%, tinción coloidal):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular

Carril	Muestra
2	Referencia, AUXI y AUXII
3	3 horas
4	4 horas
5	5 horas
6	6 horas
7	7 horas
8	8 horas
9	9 horas
10	10 horas
11	11 horas

La Figura 56 es un análisis de SDS-PAGE que muestra el curso temporal de GCFT05d (fermentación discontinua con Proteosa Peptona #3), gel de Tris-glicina al 8%, tinción coloidal):

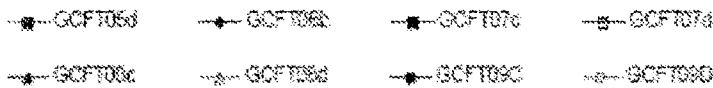
Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	Referencia, AUXI y AUXII
3	3 horas
4	4 horas
5	5 horas
6	6 horas
7	7 horas
8	8 horas
9	9 horas
10	10 horas
11	11 horas

5

La Figura 57 es un análisis de SDS-PAGE que muestra el curso temporal de DCFT24b (fermentación alimentada discontinua con Fitona peptona), (gel de Tris-glicina al 8%, tinción coloidal):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	AUXI - 0.27 µg
3	AUXII - 0.29 µg
4	20 horas - Momento de cosecha
5	19 horas
6	17 horas
7	16 horas
8	15 horas
9	14 horas
10	13 horas
11	11,6 horas
12	10,5 horas

10 La Figura 58 ilustra una comparación de curvas de crecimiento de las fermentaciones de *C. histolyticum* utilizando diferentes lotes de PP3:



15

La Figura 59 ilustra una comparación a pequeña escala de tres lotes de PP3 y evaluación

■ lote 5354798 (50 g/l) □ lote 5332398 (50 g/l)

20

de 100 g/l de PP3: ■ lote 5325835 (50 g/l) □ lote 5332398 (100 g/l).

La Figura 60 representa perfiles de crecimiento de dos fermentaciones de 5 l que utilizan PP3 a 100 g/l:

25

—●— PBFT70c n.º de lote 5354796 —■— PBFT70d n.º de lote 5325635.

La Figura 61 es un análisis de SDS-PAGE del curso temporal de fermentación de PBFT70c, 100 g/l de PP3 (lote # 5354796) (Tris-glicina al 8%):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	Referencia, 0.4 µg AUXI y AUXII
3	3,1 horas
4	4,4 horas
5	5,5 horas
6	6,6 horas
7	8,0 horas
8	9,1 horas
9	10,1 horas
10	11,4 horas
11	12,0 horas

La Figura 62 es un análisis de SDS-PAGE del curso temporal de la fermentación de PBFT70d, 100 g/l de PP3 (lote # 5325635) (Tris-glicina al 8%):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	Referencia, 0.4 µg AUXI y AUXII
3	3,1 horas
4	4,3 horas
5	5,5 horas
6	6,6 horas
7	7,8 horas
8	9,1 horas
9	10,1 horas
10	11,3 horas
11	12,0 horas

5

La Figura 63 representa un análisis de densitometría de SDS-PAGE para comparar el crecimiento celular con la formación del producto a partir de fermentación de 5 l de PBFT70c:

--- Precursor —●— Aux 1 —●— Aux 2 —●— OD.

10

La Figura 64 ilustra una comparación del proceso de PP3 100 g/l a escala de 5 l y 200 l:

▲ PBFT70c ▲ PBFT70d ● fermentación de aumento de escala de 200 l

15

La Figura 65 es un análisis de SDS-PAGE del curso temporal de la fermentación de 200L (Tris-glicina al 8%):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	Referencia mixta de AUXI y AUXII (1.2 µg)
3	4 horas
4	6 horas
5	8 horas
6	9,4 horas
7	12 horas
8	14 horas

La Figura 66 representa un análisis de densitometría de SDS-PAGE para comparar el crecimiento celular con la formación del producto a partir de fermentación de 200 l:

20

--- Precursor —●— Aux 1 —●— Aux 2 —●— OD.

La Figura 67 es un análisis de SDS-PAGE del curso temporal de la fermentación de 200 l (Bis-Tris al 4-12%):

Carril	Muestra
1	Marcador de alto peso molecular
2	Referencia mixta de AUXI y AUXII (1.2 µg)
3	4 horas
4	6 horas
5	8 horas
6	9,4 horas
7	12 horas
8	14 horas

La Figura 68 muestra una curva patrón para la cuantificación por densitometría de la concentración de colagenasa.

La Figura 69 representa una ilustración esquemática de la fermentación y cosecha de *Clostridium histolyticum*.

5

Las Figuras 70 (a) y (b) son cromatogramas resultantes de la cromatografía de interacción hidrófoba usando Fenil Sefarosa FF (sub bajo): (a) es cromatograma a escala completa y (b) es un cromatograma expandido que muestra la recolección de fracciones.

10

La Figura 71 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso desde la etapa Mustang Q a la etapa TFF 1. El gel se tiñe con azul Coloidal y se sobrecarga (2,5 µg de proteína total/carril) para mostrar bandas contaminantes:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado post Mustang Q	15
3	Bolsa 1 pre HIC	15
4	Bolsa 2 pre HIC	15
5	Bolsa 1 de flujo continuo de HIC	15
6	Bolsa 2 de flujo continuo de HIC	15
7	Pico 1 de HIC (lavado con SA 0,3M)	15
8	Grupo post HIC (pico 2)	15
9	Pre TFF (grupo post HIC + 2 días de espera)	15
10	Post TFF	15
11	Pre Q-AEX (post TFF + durante la noche)	15

15

La Figura 72 es un cromatograma de intercambio iónico (Q Sepharose HP) del material post HIC después de la concentración y diafiltración en Tris 10 mM, leupeptina 200 µM pH 8.

La Figura 73 es un análisis de SDS-PAGE con Bis Tris al 4-12% de fracciones del pico 1 (AUXII) eluidas durante la columna de intercambio iónico (figura 5). Gel 1: el gel se tiñe con azul Coloidal:

20

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	10
2	Referencia de colagenasa ABC I	1 µg 15
3	Referencia de colagenasa ABC II	1 µg 15
4	Carga	1 µg 15
5	Fracción 1	pura 15
6	Fracción 2	pura 15
7	Fracción 3	pura 15
8	Fracción 4	1 µg 15
9	Fracción 5	1 µg 15
10	Fracción 6	1 µg 15
11	Fracción 7	1 µg 15
12	Fracción 8	1 µg 15

} Fracciones de AUXII

La Figura 74 es un análisis de SDS-PAGE con Bis Tris al 4-12% de fracciones del pico 1 (AUXII) eluidas durante la columna de intercambio iónico (figura 5). Gel 2: el gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	10
2	Referencia de colagenasa ABC I	1 µg 15
3	Referencia de colagenasa ABC II	1 µg 15
4	Fracción 9	1 µg 15
5	Fracción 10	1 µg 15
6	Fracción 11	1 µg 15
7	Fracción 12	1 µg 15
8	Cola de pico 1	1 µg 15

} Fracciones de AUXII

25

La Figura 75 es un análisis de SDS-PAGE con Bis Tris al 4-12% de fracciones del pico 2 (AUXI) eluidas durante la columna de intercambio iónico (figura 5). Gel 3: el gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	10
2	Referencia de colagenasa ABC I	1 µg 15

Carril	Muestra		Volumen de carga, μ l
3	Referencia de colagenasa ABC II	1 μ g	15
4	Fracción 13	pura	15
5	Fracción 14	1 μ g	15
6	Fracción 15	1 μ g	15
7	Fracción 16	1 μ g	15
8	Fracción 17	1 μ g	15
9	Fracción 18	1 μ g	15
10	Fracción 19	1 μ g	15
11	Fracción 20	1 μ g	15
12	Fracción 21	1 μ g	15

} Fracciones de AUX I

La Figura 76 es un análisis de SDS-PAGE con Bis Tris al 4-12% de fracciones del pico 2 (AUX I) eluidas durante la columna de intercambio iónico (figura 5). Gel 4: el gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra		Volumen de carga, μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12		10
2	Referencia de colagenasa ABC I	1 μ g	15
3	Referencia de colagenasa ABC II	1 μ g	15
4	Fracción 22	1 μ g	15
5	Fracción 23	1 μ g	15
6	Fracción 24	1 μ g	15
7	Fracción 25	1 μ g	15
8	Fracción 26	1 μ g	15
9	Fracción 27	1 μ g	15
10	Cola de pico 2	1 μ g	15

} Fracciones de AUX I

5

La Figura 77 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso desde la etapa de intercambio aniónico hasta el producto final. El gel se tiñe con azul Coloidal. Gel 1: carga de 1 μ g/carril:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12	10
2	Referencia de ABC I	15
3	Referencia de ABC II	15
4	Grupo Post IEX AUX I	15
5	Grupo Post IEX AUX II	15
6	AUX I Intermedio (DOM: 12MAY06)	15
7	AUX II Intermedio (DOM: 10MAY06)	15
8	AUX I Intermedio (premezcla)	15
9	AUX II Intermedio (premezcla)	15
10	Sustancia Farmacéutica (DOM: 15MAY06)	15

10 La Figura 78 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso desde la etapa de intercambio aniónico hasta el producto final. El gel se tiñe con azul Coloidal. Gel 2: carga de 2,5 μ g/carril:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12	10
2	Referencia de ABC I	15
3	Referencia de ABC II	15
4	Grupo Post IEX AUX I	15
5	Grupo Post IEX AUX II	15
6	AUX I Intermedio (DOM: 12MAY06)	15
7	AUX II Intermedio (DOM: 10MAY06)	15
8	AUX I Intermedio (premezcla)	15
9	AUX II Intermedio (premezcla)	15
10	Sustancia Farmacéutica (DOM: 15MAY06)	15

15 La Figura 79 es una SDS-PAGE con Tris Glicina al 8% (NB Ref. SA/1640/020):

1. Marcadores de alto peso molecular
2. Carril en blanco
3. 1 μ g de Filtrado de Fermentación Día 4
- 20 4. 1 μ g de Filtrado de Fermentación Día 5
5. 1 μ g de Post Mustang Q Día 4
6. 1 μ g de Post HIC Día 3

- 7. 1 µg de Post HIC Día 6
- 8. 1 µg de Post TFF Día 2
- 9. 1 µg de Post TFF Día 4

5 La Figura 80 es una SDS-PAGE con Tris Glicina al 8%:

- 1. Marcadores de alto peso molecular
- 2. 1 µg de referencia de AUX-I
- 3. 1 µg de referencia de AUX-II
- 10 4. 1 µg de Post IEX AUX-I Día 5
- 5. 1 µg de Post IEX AUX-I Día 12
- 6. 1 µg de Post IEX AUX-II Día 5
- 7. 1 µg de Post IEX AUX-II Día 12

15 La Figura 81 es un gel de SDS-PAGE:

- 1. Marcadores de alto peso molecular
- 2. 1 µg de referencia de AUX-I
- 3. 1 µg de referencia de AUX-II
- 20 4. 1 µg de AUX-I Intermedio Día 5
- 5. 1 µg de AUX-I Intermedio Día 12
- 6. 1 µg AUX-II Intermedio Día 5
- 7. 1 µg AUX-II Intermedio Día 12

25 La Figura 82 representa el análisis de cromatografía analítica.

La Figura 83 muestra la determinación de la concentración de proteínas por UV.

30 La Figura 84 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso de la pasada de demostración de 20 l tomado en el punto de fabricación y almacenado a -20 °C. El gel se tiñe con azul Coloidal. 1 µg de carga:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado post Mustang Q	15
3	Bolsa 1 pre HIC	15
4	Bolsa 2 pre HIC	15
5	Bolsa 1 de flujo continuo de HIC	15
6	Bolsa 2 de flujo continuo de HIC	15
7	Pico 1 de HIC (lavado con SA 0,3M)	15
8	Grupo post HIC	15
9	Pre TFF1 (grupo post HIC + espera de fin de semana)	15
10	Post TFF1	15
11	Pre Q-AEX (post TFF + durante la noche)	15

35 La Figura 85 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso de la pasada de demostración de 20 l después de 22 horas a temperatura ambiente. El gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga, µl
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado pre Mustang Q	15
3	Filtrado post Mustang Q	15
4	Bolsa 1 pre HIC	15
5	Bolsa 2 pre HIC	15
6	Grupo post HIC	15
7	Pre TFF1	15
8	Post TFF1	15
9	Grupo Post IEX AUX I	15
10	Grupo Post IEX AUX II	15
11	AUX I Intermedio	15
12	AUX II intermedio	15

} 1 µg de carga

40 La Figura 86 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12 % de muestras en proceso de la pasada de demostración de 20 l después de 22 horas a 37 °C. El gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado pre Mustang Q	15
3	Filtrado post Mustang Q	15
4	Bolsa 1 pre HIC	15
5	Bolsa 2 pre HIC	15
6	Grupo post HIC	15
7	Pre TFF1	15
8	Post TFF1	15
9	Grupo Post IEX AUX I	15
10	Grupo Post IEX AUX II	15
11	AUX I intermedio	15
12	AUX II intermedio	15

} 1 μ g de carga

La Figura 87 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% de muestras en proceso de la pasada de demostración de 20 l después de 94 horas a temperatura ambiente. El gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado pre Mustang Q	15
3	Filtrado post Mustang Q	15
4	Bolsa 1 pre HIC	15
5	Bolsa 2 pre HIC	15
6	Grupo post HIC	15
7	Pre TFF1	15
8	Post TFF1	15
9	Grupo Post IEX AUX I	15
10	Grupo Post IEX AUX II	15
11	AUX I intermedio	15
12	AUX II intermedio	15

} 1 μ g de carga

5

La Figura 88 es un análisis de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12 % de muestras en proceso de la pasada de demostración de 20 l después de 94 horas a 37 °C. El gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra	Volumen de carga, μ l
1	Marcador de peso molecular Mark 12	12
2	Filtrado pre Mustang Q	15
3	Filtrado post Mustang Q	15
4	Bolsa 1 pre HIC	15
5	Bolsa 2 pre HIC	15
6	Grupo post HIC	15
7	Pre TFF1	15
8	Post TFF1	15
9	Grupo Post IEX AUX I	15
10	Grupo Post IEX AUX II	15
11	AUX I intermedio	15
12	AUX II intermedio	15

} 1 μ g de carga

10

La Figura 89 es un análisis de SDS-PAGE con Tris-Glicina al 8% de fracciones seleccionadas post IEX AUX I y post IEX AUX II. Las fracciones se seleccionaron del experimento de demostración de 20 l, que se enriquecieron para la proteína contaminante requerida. El gel se tiñe con azul Coloidal:

Carril	Muestra		Volumen de carga, µl
1	Fracción 16 de Post IEX AUX I	}	20
2	Fracción 16 de Post IEX AUX I		20
3	Fracción 16 de Post IEX AUX I		20
4	Fracción 16 de Post IEX AUX I		20
5	Fracción 16 de Post IEX AUX I		20
6	Fracción 2 de Post IEX AUX II	}	20
7	Fracción 2 de Post IEX AUX II		20
8	Fracción 2 de Post IEX AUX II		20
9	Fracción 2 de Post IEX AUX II		20
10	Fracción 2 de Post IEX AUX II		20

La Figura 90 es un análisis de SDS-PAGE con Tris-Glicina al 8% de fracciones seleccionadas post IEX AUX I y post IEX AUX II. Las fracciones se seleccionaron del material purificado generado a partir de la fermentación de 20 l de PP3 y enriquecido para la proteína contaminante de ~90 kDa. El gel se tiñe con azul Coloidal:

5

Carril	Muestra		Volumen de carga, µl
1	Marcador de alto peso molecular		20
2	Fracción B7 R2 Post IEX	}	20
3	Fracción B7R2 Post IEX		20
4	Fracción B7R2 Post IEX		20
5	Fracción B7R2 Post IEX		20
6	Fracción D1 Post IEX		20
7	Fracción D1 Post IEX	}	20
8	Fracción D1 Post IEX		20
9	Fracción D1 Post IEX		20
10	Fracción D1 Post IEX		20

} eluida con AUXII

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 En un aspecto, la invención proporciona una sustancia farmacéutica, que comprende como únicos ingredientes activos colagenasa I y colagenasa II de Clostridium histolyticum, aisladas y purificadas, presentes en una relación másica de alrededor de 1: 1, en la que tanto la colagenasa I como la colagenasa II son al menos 95% puras por área según se determina por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa. Se ha descubierto que una composición que comprende una mezcla de colagenasa I y colagenasa II en una relación másica artificial de 1 a 1 proporciona una actividad enzimática óptima y altamente reproducible e imparte un efecto terapéutico superior al tiempo que reduce el potencial de efectos secundarios. Se entiende que los términos "sustancia farmacéutica", "producto farmacéutico" o "composición de colagenasa" se pueden usar indistintamente.

20 En algunas realizaciones, la sustancia farmacéutica tiene al menos una especificación seleccionada de la tabla A a continuación:

Tabla A

Ensayo	Especificación	
	AUX - I	AUX- II
Aspecto	Transparente incoloro y esencialmente libre de partículas	
Medida potenciométrica del pH de la Solución	7,5 a 8,5	
Endotoxina	< 10 UE/ml	

Ensayo	Especificación	
	AUX - I	AUX- II
Identidad (y pureza) por SDS-PAGE (condiciones reductoras, teñido con Coomassie y plata)	Banda principal de colagenasa entre marcadores de MW de 98 y 188 kDa	Banda principal de colagenasa entre 97 - 200 kDa; Marcadores de MW; Bandas principales comparables al patrón de referencia
Proteínas totales por espectroscopia de absorbancia	0,8 - 1,2 mg/ml	
Ensayo de SRC (AUX-I)	13 000 - 23 000 unidades de fSRC/mg	ND
Ensayo de GPA (AUX-II)	ND	230 000 - 430 000 unidades de fGPA/mg
Proteína de la célula hospedadora residual	Comparable al patrón de referencia; ninguna banda de impureza individual que muestre mayor intensidad que el marcador de intensidad BSA al 1%	
ADN de la célula hospedadora residual	≤ 10 pg/dosis	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	≥ 98% del pico principal; ≤ 2 % de agregados por área	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad y pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	2 picos principales (AUX I y AUX II), combinados ≥ 97% por área; Tiempos de retención de AUX-I y AUX-II dentro del 5% de referencia	
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (clostripaina residual por cromatografía de líquidos de fase inversa)	≤ 1 % por área	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (Gelatinasa residual por cromatografía de intercambio aniónico)	≤ 1 % por área	
Leupeptina residual por cromatografía de fase inversa	1ug/mg p/p	
Carga biológica	< 1 ufc/ml	

En un aspecto, la invención proporciona un proceso para producir una sustancia farmacéutica de la invención, que comprende las etapas de:

- 5 a) fermentar la *Clostridium histolyticum*;
- b) cosechar una fermentación bruta que comprende colagenasa I y colagenasa II;
- 10 c) purificar la colagenasa I y la colagenasa II de la cosecha bruta mediante filtración y cromatografía en columna; y
- d) combinar la colagenasa I y la colagenasa II purificadas de la etapa (c) en una relación de alrededor de 1 a 1, en el que la etapa de purificación comprende las etapas de:
 - 15 i) filtrar la cosecha bruta a través de un filtro de intercambio aniónico;
 - ii) añadir sulfato de amonio;
 - 20 iii) filtrar la cosecha bruta;
 - iv) hacer pasar la cosecha a través de una columna HIC;
 - v) añadir leupeptina al filtrado;
 - 25 vi) eliminar el sulfato de amonio y mantener la leupeptina para una correcta unión de colagenasa I y colagenasa II con intercambio de amortiguador por TFF;

vii) filtrar la mezcla de la etapa (vi); y

viii) separar la colagenasa I y la colagenasa II utilizando cromatografía de intercambio aniónico;

5 ix) preparar la concentración y formulación de TFF para colagenasa I y colagenasa II por separado; y

x) filtrar a través de un sistema de filtración de 0,2 µm.

10 En una realización preferida, la etapa de fermentación se realiza en presencia de un derivado porcino, una fitona peptona o un medio de peptona vegetal. Más preferiblemente, el medio derivado porcino es proteosa peptona #3. En una realización, el procedimiento de fermentación comprende las etapas de:

15 a) inocular el medio en una primera etapa con *Clostridium histolyticum* y agitar la mezcla;

b) incubar la mezcla de la etapa (a) para obtener una alícuota;

c) inocular el medio en una segunda etapa con alícuotas resultantes de la etapa (b) y agitar la mezcla;

20 d) incubar mezclas de la etapa (c);

e) inocular el medio en una tercera etapa con alícuotas resultantes de la etapa (d) y agitar;

25 f) incubar las mezclas de la etapa (e);

g) inocular el medio en una cuarta etapa con una alícuota resultante de la etapa (f) y agitar;

h) incubar mezclas de la etapa (g); y

30 i) cosechar el cultivo resultante de la etapa (h) por filtración.

En una realización preferida, el procedimiento de fermentación comprende las etapas de:

35 a) Inocular 3 x 25 ml de medio PP3 (proteosa peptona) con 3 x 250 µl de WCB (cultivos de 25 ml en 3 x matraces de agitación de 125 ml, contenida dentro del recipiente de gas Anaerobe) a un punto de ajuste de temperatura de 37 °C y agitar la mezcla a 125 rpm;

b) incubar la mezcla de la etapa (a) durante 12 horas;

40 c) inocular el medio PP3 4 x 200 ml con 4 x alícuotas de 5 ml de 1 de los cultivos de aproximadamente 25 ml (cultivos de 200 ml en 4 x 500 ml en matraces de agitación, contenida dentro del recipiente de gas Anaerobe) a un punto de ajuste de temperatura de 37 °C, y agitar la mezcla a 125 rpm;

45 d) incubar mezclas de la etapa (c) durante 12 horas;

e) inocular 14,4 l de medio PP3 con 3 x cultivo de 200 ml (cultivo de 15 l en fermentador de 20 l) a un punto de ajuste de temperatura de 37 °C y un punto de ajuste de pH de 7,00, y agitar la mezcla a 125 rpm;

50 f) incubar mezclas de la etapa (e) durante 12 horas;

g) inocular 192 l de medio PP3 con 8 l de cultivo de 15 l (cultivo de 200 l de cultivo en fermentador de 270L) a un punto de ajuste de temperatura de 37 °C y un punto de ajuste de pH de 7,00, y agitar la mezcla a 125 rpm;

55 h) incubar mezclas de la etapa (g) durante 14 horas; y

i) cosechar el cultivo de 200 l por filtración (profundidad seguida por 0,2 µm) a través de Millipore Millistak 4m² y filtro de 0,2 µm (2 x filtros Millipore Express XL 10) a un caudal de 200 l/h.

60 En una realización, el procedimiento de purificación comprende las etapas de:

a) filtrar la cosecha bruta a través de un filtro de cápsula de intercambio aniónico Mustang Q;

65 b) añadir sulfato de amonio; preferentemente a una concentración final de 1M;

c) filtrar la cosecha bruta; preferentemente a través de un filtro de 0,45 µm;

- d) someter el filtrado a través de una columna HIC; preferentemente una fenil Sepharose 6FF (sub bajo);
- e) añadir leupeptina al filtrado; preferentemente a una concentración final de 0,2 mM al producto eluido post HIC;
- f) eliminar el sulfato de amonio y mantener la leupeptina para una correcta unión de colagenasa I y colagenasa II con intercambio de amortiguador por TFF; preferentemente con intercambio de amortiguador por TFF;
- g) filtrar la mezcla de la etapa (f); preferentemente a través de un filtro de 0,45 µm;
- h) separar colagenasa I y colagenasa II usando Q-Sepharose HP;
- i) preparar la concentración de TFF y la formulación para colagenasa I y colagenasa II por separado; en donde TFF es una filtración de flujo tangencial que utiliza 10 y/o 30K MWCO (límite de peso molecular) PES o RC - polietersulfona o membranas de filtro de celulosa regenerada. Proporciona medios para retener y concentrar la proteína seleccionada e intercambiar la proteína de una solución amortiguador a otra; y
- j) filtrar a través de un sistema de filtración de 0,2 µm.

La sustancia farmacéutica de la presente invención incluye tanto colagenasa I como colagenasa II. Una fuente preferida de colagenasa bruta proviene de un proceso de fermentación bacteriana, específicamente la fermentación de *C. histolyticum* (*C. his*). En una realización de la invención, se describe un proceso de fermentación. La colagenasa bruta obtenida de *C. his* puede purificarse mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo cromatografía de afinidad de ligando de colorante, cromatografía de afinidad con heparina, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de quelación de metales. La colagenasa bruta y parcialmente purificada está disponible comercialmente de muchas fuentes, incluyendo Advance Biofactures Corp., Lynbrook, Nueva York.

Tanto la colagenasa I como la colagenasa II son metaloproteasas y requieren zinc fuertemente unido y calcio ligeramente unido para su actividad (Eddie L. Angleton y H. E. Van Wart, *Biochemistry* 1988, 27, 7406 - 7412). Ambas colagenasas tienen una amplia especificidad hacia todos los tipos de colágeno (Steinbrink, D; Bond, M y Van Wart, H; (1985), *JBC*, 260 p2771-2776). La colagenasa I y la colagenasa II digieren el colágeno hidrolizando la región de hélice triple del colágeno en condiciones fisiológicas (Steinbrink, D; Bond, M y Van Wart, H; (1985), *JBC*, 260 p2771-2776). Aunque cada colagenasa muestra una especificidad diferente (por ejemplo, cada una tiene una secuencia amino preferida diferente para la escisión), conjuntamente, tienen una actividad sinérgica hacia el colágeno [Mandl, I., (1964), *Biochemistry*, 3: p.1737-1741; Vos-Scheperkeuter, GH, (1997), *Cell Transplantation*, 6: p.403-412]. La colagenasa II tiene una actividad más alta hacia todos los tipos de sustratos peptídicos sintéticos que la colagenasa I, según se informa para la colagenasa de clase II y clase I en las bibliografías. [Bond, M.D. (1984), *Biochemistry*, 23: p.3085-3091. Hesse, F, (1995), *Transplantation Proceedings*, 27: p.3287-3289].

Los ejemplos de enfermedades mediadas por colágeno que pueden tratarse mediante las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Dupuytren; enfermedad de Peyronie; hombro congelado (capsulitis adhesiva), queloides; cicatrices hipertróficas; cicatrices deprimidas como las que resultan del acné inflamatorio; adherencias postquirúrgicas; acné común; lipomas, y condiciones desfigurantes tales como arrugas, formación de celulitis y fibrosis neoplásica. Las patentes de EE. UU. núms. 6.086.872 y 5.589.171 describen el uso de preparaciones de colagenasa en el tratamiento de la enfermedad de Dupuytren. La patente de EE. UU. núm. 6.022.539 describe el uso de preparaciones de colagenasa en el tratamiento de la enfermedad de Peyronie.

Además de su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por colágeno, la composición de la invención también es útil para la disociación de tejido en células individuales y grupos de células, como es útil en una amplia variedad de aplicaciones de laboratorio, diagnósticas y terapéuticas. Estas aplicaciones implican el aislamiento de muchos tipos de células para diversos usos, incluidas las células endoteliales microvasculares para la siembra de injertos vasculares sintéticos de diámetro pequeño, hepatocitos para terapia génica, detección de toxicología de fármacos y dispositivos de asistencia hepática extracorpórea, condrocitos para la regeneración del cartílago, e islotes de Langerhans para el tratamiento de la diabetes mellitus dependiente de insulina. El tratamiento enzimático trabaja para fragmentar proteínas de la matriz extracelular y proteínas que mantienen el contacto de célula a célula. Debido a que el colágeno es el principal componente proteico de la ultraestructura tisular, la enzima colagenasa se ha usado con frecuencia para lograr la desintegración tisular deseada. En general, la composición de la presente invención es útil para cualquier aplicación en la que se desea la eliminación de células o la modificación de una matriz extracelular.

Las composiciones de colagenasa de la invención también pueden prepararse mezclando un número específico de unidades de actividad o masas específicas de las enzimas preferentemente purificadas. La actividad de la colagenasa se puede medir por la capacidad de la enzima para hidrolizar el péptido sintético o el sustrato de

colágeno. Los expertos en la técnica reconocerán que los ensayos enzimáticos distintos de los descritos aquí también se pueden usar para definir y preparar composiciones enzimáticas funcionalmente equivalentes.

Otro aspecto de la presente invención es la optimización reproducible de la relación másica de 1 a 1 de colagenasa I a colagenasa II en la composición de la invención. La reproducibilidad de la relación de colagenasa I a colagenasa II ha sido previamente un desafío debido a varios factores. En primer lugar, la fermentación comercial de *Clostridium* generalmente da como resultado una relación de colagenasa I y colagenasa II de 1 a 2. En segundo lugar, se sabe que los procedimientos de purificación alteran esta relación significativamente, dando como resultado relaciones inconsistentes del producto purificado. La relación másica fija optimizada de la composición de la presente invención maximiza la actividad sinérgica proporcionada por las dos colagenasas diferentes, dando como resultado un beneficio terapéutico superior.

La invención también proporciona formulaciones farmacéuticas de las composiciones de la invención. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de colagenasa de la presente invención formulada junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Como se usa aquí, la expresión "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de la formulación, no tóxica, inerte, sólida, semisólida o líquida, de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tal como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; glicoles, tales como propilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua apirógena; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico y soluciones amortiguadoras de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar también presentes en la composición, según el criterio del experto en formulación.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse por vía parenteral, tópica o por medio de un depósito implantado. El término parenteral, como se usa aquí, incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión. Preferiblemente, la composición se inyecta en el tejido desfigurante. En el caso de las enfermedades de Peyronie o Dupuytren o la capsulitis adhesiva, la composición se inyecta en el cordón o la placa. La expresión "administración local" se define aquí para abarcar dicha inyección directa.

Además, se pueden obtener resultados particularmente buenos inmovilizando el sitio de inyección después de la administración. Por ejemplo, el sitio de administración se puede inmovilizar durante 4 horas o más.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1, 3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, solución de cloruro sódico U.S.P. e isotónica. Además, aceites fijos estériles se usan convencionalmente en forma de un disolvente o un medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de los inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso. Las soluciones estériles también se pueden liofilizar para su uso posterior.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizadores, inhaladores o parches. El componente activo se premezcla en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o amortiguador necesario, según se requiera.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de los compuestos de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos cálcicos y polvo de poliamida, o mezclas de estas

sustancias. Los pulverizadores pueden contener además propulsores habituales tales como clorofluorohidrocarburos.

5 Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispensando el compuesto en el medio adecuado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

10 En una realización preferida, la sustancia farmacéutica de la invención es una composición inyectable liofilizada formulada con lactosa. En una realización, cada miligramo de colagenasa inyectable puede formularse con 1,9 mg de lactosa. En otra realización, cada miligramo de colagenasa de inyección preferentemente tiene aproximadamente 2800 unidades SRC y 51000 unidades medidas con un ensayo de potencia utilizando un sustrato sintético, pzGPPGPA.

15 En otra realización preferida, la composición de colagenasa de la invención es una composición inyectable liofilizada formulada con sacarosa, Tris a un nivel de pH de aproximadamente 8,0. Lo más preferente, 1,0 mg de la sustancia farmacéutica de la invención se formula en sacarosa 60 mM, Tris 10 mM, a un pH de aproximadamente 8,0 (esto equivale a 20,5 mg/ml de sacarosa y 1,21 mg/ml de Tris en el amortiguador de formulación). Ejemplos de algunas de las formulaciones incluyen, pero sin limitación: para una dosis de 0,58 mg de la sustancia farmacéutica, se añaden 18,5 mg de sacarosa y 1,1 mg de Tris en cada vial, en el que el objetivo de un volumen de llenado del vial es 0,9 ml; y para una dosis de 0,58 mg de la sustancia farmacéutica, 12,0 mg de sacarosa (multicompendial) y 0,7 mg de Tris (multicompendial).

25 La invención proporciona la sustancia farmacéutica de la invención para su uso en medicina. Los métodos para tratar enfermedades mediadas por colágeno pueden comprender la etapa de administrar, a un paciente que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención, o una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica de la invención. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención se entiende una cantidad del compuesto que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicada a cualquier tratamiento médico.

30 El efecto terapéuticamente eficaz puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto proporciona una indicación de o percibe un efecto). Las dosis efectivas también variarán dependiendo de la vía de administración, así como la posibilidad de uso conjunto con otros agentes. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico responsable dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o simultáneamente con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en la práctica médica.

45 La sustancia farmacéutica para la colagenasa inyectable consiste en dos colagenasas microbianas, denominadas colagenasa AUX I y colagenasa ABC I y colagenasa AUX II y colagenasa ABC II. Se entiende que los términos "Colagenasa I", "ABC I", "AUX I", "colagenasa AUX I" y "colagenasa ABC I" significan lo mismo y se pueden usar indistintamente. Asimismo, los términos "Colagenasa II", "ABC II", "AUX II", "colagenasa AUX II" y "colagenasa ABC II" se refieren a la misma enzima y pueden también usarse indistintamente. Estas colagenasas son segregadas por células bacterianas. Se aíslan y se purifican a partir del sobrenadante de cultivo de *Clostridium histolyticum* mediante métodos cromatográficos. Ambas colagenasas son proteasas especiales y comparten el mismo número de EC (E.C 3.4.24.3).

50 La colagenasa AUX I tiene una única cadena polipeptídica que consiste en aproximadamente 1000 aminoácidos con un peso molecular de 115 kDa. La colagenasa AUX II tiene también una única cadena polipeptídica que consiste en aproximadamente 1000 aminoácidos con un peso molecular de 110 kDa.

60 Aunque la bibliografía indica que existen homologías de secuencia en las regiones de la colagenasa AUX I y AUX II, los dos polipéptidos no parecen tener reactividad cruzada inmunológica como lo indica el análisis de transferencia Western.

La sustancia farmacéutica (concentrado de colagenasa) tiene una relación másica de aproximadamente 1 a 1 para la colagenasa AUX I y AUX II. El concentrado de colagenasa tiene un coeficiente de extinción de 1,528.

Ejemplos

65

Las composiciones y procedimientos de la presente invención se comprenderá mejor en conexión con los siguientes ejemplos, que están destinados únicamente ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Diversos cambios y modificaciones a las realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica, y se pueden hacer tales cambios y modificaciones que incluyen, sin limitación, aquellos relacionados con los procedimientos, formulaciones y/o métodos de la invención, sin alejarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

PROCESO 2:

Proceso de fermentación

Este trabajo se propuso desarrollar un proceso de fermentación que tenía como objetivo proporcionar un rendimiento diana de 250 mg/l de colagenasas ABC I y II totales a partir del proceso de fermentación a escala de 5 litros en un medio de crecimiento de componentes libres de animales. Se analizaron varias fuentes de nitrógeno alternativas potenciales para ver si tenían algún efecto en la expresión de colagenasa y en el componente de fitona que se usa actualmente en los medios de crecimiento. Un experimento que compara las productividades de dos cepas de *C. histolyticum*, 004 y 013, fue determinar cualquier diferencia entre las dos cepas con respecto a las cinéticas de crecimiento, la productividad de la colagenasa y la producción de proteasas contaminantes cultivadas en un medio derivado de animales. Esta comparación resaltó diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa de *C. histolyticum* en medios derivados de animales en lugar de medios de crecimiento no de animales.

Los resultados anteriores describieron que se demostró que el aumento de las concentraciones de fitona y extracto de levadura soportan concentraciones más altas de biomasa y, por lo tanto, niveles más altos de expresión de colagenasa total. En un intento por aumentar aún más las concentraciones de biomasa y la productividad total de colagenasa de los medios de fermentación discontinua optimizados, se diseñó una estrategia de fermentación alimentada discontinua. Se realizaron dos fermentaciones de 5 litros, una con una alta concentración de medios en la fase discontinua seguida de una fase de alimentación discontinua de baja concentración, la segunda con una baja concentración de medios en la fase discontinua seguida de una fase de alimentación de alta concentración. Ambas fermentaciones produjeron altas concentraciones de biomasa, sin embargo, la fase discontinua de alta concentración mostró niveles relativamente bajos de expresión de colagenasa. La fermentación discontinua de baja concentración mostró niveles muy altos de expresión de colagenasa (~ 280 mg/l), sin embargo, este cultivo también produjo cantidades significativas de la proteasa contaminante, clostripaína.

Aunque la fermentación discontinua de baja concentración dio muy buenos resultados con respecto a la expresión de las colagenasas, la solución de alimentación de extracto de levadura y fitona altamente concentrada fue muy difícil de preparar. Se realizaron dos fermentaciones adicionales, la primera fue una repetición de la anterior fermentación alimentada discontinua exitosa, la segunda tenía una composición de medios de fase discontinua de concentración ligeramente más alta con una solución de alimentación concentrada inferior. Ambas fermentaciones lograron concentraciones de biomasa similares y mostraron el mismo perfil de expresión de las colagenasas y clostripaína. La cantidad de colagenasa producida se estimó nuevamente en aproximadamente 280 mg/l en ambas fermentaciones. Sin embargo, estas fermentaciones produjeron cantidades significativas de la proteasa clostripaína contaminante.

Se evaluó una selección de fuentes de nitrógeno alternativas por su capacidad para reemplazar la fitona peptona utilizada en la estrategia de fermentación alimentada discontinua. La *C. histolyticum* creció extremadamente bien en las peptonas vegetales, alcanzando densidades ópticas (600 nm) de 4 a 5 unidades. Sin embargo, el análisis de SDS-PAGE de estas fermentaciones no mostró expresión de colagenasa ni clostripaína. Debido al exuberante crecimiento celular observado en estas peptonas, se pensó que la concentración de una fuente de nitrógeno compleja era demasiado alta, dando como resultado una inhibición de la expresión de proteasas. Por lo tanto, se llevó a cabo un segundo conjunto de fermentaciones utilizando las peptonas alternativas a 50 g/l en una estrategia discontinua. Cuando las fermentaciones se analizaron mediante SDS-PAGE, no se volvió a ver la expresión de colagenasa ni clostripaína. Una fermentación alimentada discontinua con fitona peptona se complementó con tres aminoácidos, glutamina, triptófano y asparagina. Estos aminoácidos se identificaron como presentes en cantidades más bajas en los medios no animales. El perfil de crecimiento de la fermentación fue muy similar al de la fermentación alimentada discontinua sin suplementación de aminoácidos. El análisis de SDS-PAGE mostró un rendimiento similar de colagenasa pero un nivel ligeramente más bajo de clostripaína. El ensayo de clostripaína mostró una actividad reducida en el amino suplementado cuando se comparó con el control de la fermentación alimentada discontinua. La reducción en la actividad de clostripaína aunque todavía era significativa no fue tan grande como la diferencia entre los medios animales y no animales.

La evaluación de la etapa de recuperación primaria de las colagenasas utilizando precipitación con sulfato de amonio se llevó a cabo en filtrados de 0,2 µm de los sobrenadantes de fermentación brutos. El objetivo aquí era ayudar a aumentar el rendimiento de colagenasa e, idealmente, disminuir la cantidad de clostripaína que se llevó a cabo a través del proceso. Inicialmente, se evaluaron concentraciones de sulfato de amonio de 100 a 400 g/l. El sulfato de amonio a 400 g/l produjo una recuperación significativa de colagenasa. Se realizó un estudio adicional con un intervalo más alto de sulfato de amonio (400 - 520 g/l). Además, también se investigó el efecto de disminuir el pH a 6,0 y de oxigenar los medios antes de la precipitación. No se observaron diferencias ni en la cantidad de

colagenasas ni de clostripaína recuperadas del sobrenadante en cualquiera de estas condiciones. El sedimento generado a partir de 400 g/l de sulfato de amonio fue el más fácil de resuspender.

5 El estudio para comparar las dos cepas de *C. histolyticum* (004 y 013) mostró que la productividad de las colagenasas de los medios derivados de animales era menor que la de los medios óptimos no derivados de animales. El análisis de SDS-PAGE, apoyado por un ensayo enzimático para la actividad de clostripaína, destacó que había cantidades significativamente más bajas de clostripaína en el material producido a partir de los medios derivados de animales que de los medios no animales. Esto destacó el hecho de que la materia prima producida a partir de la fermentación de medios no derivados de animales era una materia prima significativamente diferente de la fermentación utilizando medios derivados de animales con respecto a la producción de proteasas contaminantes.

1^{er} conjunto de fermentaciones alimentadas discontinuas - DCFT24

15 Los resultados del trabajo de desarrollo del proceso mostraron que el uso de un medio enriquecido (100 g/l de fitona peptona y 50 g/l de extracto de levadura) daba lugar a la expresión de mayores cantidades de colagenasas en comparación con el medio original (50 g/l fitona peptona y 8,5 g/l de extracto de levadura). Además, inicialmente parecía que reducía las cantidades de clostripaína producida.

20 Después se realizaron dos fermentaciones de 5 l. En primer lugar, la estrategia consistió en una fase discontinua larga/fase alimentada discontinua corta, mientras que el segundo consistió en una fase discontinua corta/fase alimentada discontinua larga. En ambas estrategias al final de la fermentación (después de 20 h), las concentraciones de fitona peptona y de extracto de levadura fueron de 100 g/l y 50 g/l, respectivamente, como en el caso de las fermentaciones discontinuas. Las tablas 1 y 2 detallan las recetas de medios y las estrategias utilizadas.

Tabla1 Receta de medios y estrategia de alimentación discontinua

Componente	Discontinua larga- alimentada discontinua corta		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Fitona Peptona	100 g/l	100 g/l	100 g/l
Extracto de levadura	50 g/l	50 g/l	50 g/l
Glucosa	10 g/l	10 g/l	10 g/l
		Filtrado esterilizado	
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l		
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10 ml/l		
Volumen	4 l	1 l	~5 l


```

    Inoculación → [Fase discontinua 10h] → [Fase discontinua alimentada 10h] → Cosecha a las 20h
    
```

30 Tabla2 Receta de medios y estrategia de alimentación discontinua

Componente	Discontinua corta- alimentada discontinua larga		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Fitona Peptona	40 g/l	254 g/l	100 g/l
Extracto de levadura	10 g/l	153 g/l	50 g/l
Glucosa	7,5 g/l	17,8 g/l	10 g/l
		Filtrado esterilizado	
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l		
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10ml/l		
Volumen	4 l	1 l	~5 l

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento (DO_{600nm} frente al tiempo) de las dos fermentaciones, mientras que la Figura 2 muestra las curvas de crecimiento neto (DO_{600nm} neta frente al tiempo). Se observó que las células de la primera fermentación crecieron muy rápido y alcanzaron su DO máxima después de aproximadamente 10 horas. Esto se debió al hecho de que los medios en la fase discontinua eran muy ricos. Durante la fase de alimentación discontinua, las células no parecieron crecer. Los valores de DO disminuyeron ligeramente, lo que podría atribuirse en parte al hecho de que las células estaban muriendo y al efecto de dilución de la alimentación en el fermentador.

Para la segunda fermentación, la fase de alimentación discontinua se inició después de 6 horas. En ese punto, el valor de DO habría sido bajo, como lo sugiere la curva de crecimiento en la Figura 1. Las células continuaron creciendo lentamente hasta aproximadamente 18 horas.

Se observó que las curvas de crecimiento neto en la Figura 2 sugerían que las densidades celulares en la fermentación de DCFT24b eran más altas que en la fermentación de DCFT24a. La DO_{600nm} de los medios antes de la inoculación fue de aproximadamente 1,7, mientras que en DCFT24b fue de aproximadamente 0,4. Estas diferencias se deben al hecho de que cuando los fermentadores se someten a autoclave, se forma un precipitado. En el caso de DCFT24a, se formaron mayores cantidades en comparación con DCFT24b.

Geles de SDS PAGE:

Se llevó a cabo un análisis de SDS PAGE (geles de Tris-glicina al 8%) de las muestras de sobrenadante para cada una de las dos fermentaciones. Los geles se muestran en la Figura 3 y 4. También se produjo un gel de SDS PAGE semicuantitativa para la muestra del momento de cosecha de la segunda fermentación.

El análisis de gel de SDS PAGE en la Figura 4 indicó que se expresaron cantidades muy bajas de colagenasas. Esto podría deberse al hecho de que las células crecieron muy rápido durante la fase discontinua y, como resultado, se alcanzó la concentración máxima de células después de aproximadamente 10 horas. Por el contrario, se observó un alto nivel de expresión de colagenasa en la segunda fermentación, probablemente debido al hecho de que las células crecieron más lentamente durante la fase discontinua corta y continuaron creciendo durante la fase de alimentación discontinua. Por tanto, la invención se refiere a un método de fermentación mejorado para *C. his* en el que el crecimiento celular y se ralentiza durante la fase de lotes cortos y el crecimiento continuo durante la fase de lotes alimentados. Se define que crecimiento lento significa que la tasa de crecimiento durante la fase de lote corto no da como resultado una concentración celular máxima antes de la fase de lote alimentado, tal como dentro de aproximadamente 10 horas desde el inicio del proceso de fermentación. En una realización preferida, la tasa de crecimiento es aproximadamente la resultante del segundo ciclo de fermentación descrito aquí.

Las productividades estimadas de la colagenasa a partir del gel de SDS PAGE semicuantitativa en el momento de cosecha del segundo ciclo de fermentación (Figura 5) fueron 132 mg/l para la colagenasa ABC I y 158 mg/l para la colagenasa ABC II. Al comparar estos valores con los obtenidos previamente, hay un aumento de aproximadamente 3 veces en los niveles de expresión usando la estrategia de alimentación discontinua.

5 La siguiente etapa fue realizar un conjunto adicional de fermentaciones alimentadas discontinuas utilizando estrategias y medios de alimentación discontinua ligeramente modificados. El objetivo era mejorar la escalabilidad y la consistencia del proceso de fermentación.

10 La receta del medio para esta fermentación fue la misma que la anterior, con la excepción de que la fitona peptona y el extracto de levadura en la fase discontinua se esterilizaron por filtración en lugar de someterse a autoclave. Esto se hizo con el fin de evitar el autoclave del extracto de levadura y la fitona, que potencialmente pueden afectar su composición por el calor y la desnaturalización de las proteínas en los medios. Para la fermentación de DCFT26b, se incrementó la cantidad de extracto de levadura y fitona peptona. Esto se hizo para que la concentración de extracto de levadura y peptona en la alimentación fuera menor que en DCFT26a y, por lo tanto, más fácil de preparar y de esterilizar por filtración. Para ambas fermentaciones, la estrategia seguida fue la misma, una fase discontinua de 6 h seguida de una fase alimentada discontinua de 14 h. Las Tablas 3 y 4 presentan las recetas de medios, mientras que la Figura 6, la estrategia usada para ambas fermentaciones.

20 Tabla3 Receta de medios y estrategia de alimentación discontinua para DCFT26a

Componente	DCFT26a - (Discontinua corta- alimentada discontinua larga)		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Fitona Peptona	40 g/l	254 g/l	100 g/l
Extracto de levadura	10 g/l	153 g/l	50 g/l
Glucosa	7,5 g/l	17,8 g/l	10 g/l
		Filtrado esterilizado	
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l		
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10ml/l		
Volumen	3,6 l	1,4 l	~5 l

Tabla4 Receta de medios y estrategia de alimentación discontinua para DCFT26b

Componente	DCFT26b - (Discontinua corta- alimentada discontinua larga)		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Fitona Peptona	60 g/l	151,4 g/l	100 g/l
Extracto de levadura	20 g/l	127,1 g/l	50 g/l
Glucosa	7,5 g/l	17,8 g/l	10 g/l
		Filtrado esterilizado	
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l		
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10ml/l		
Volumen	3,6 l	1,4 l	~5 l

25 La Figura 7 muestra las curvas de crecimiento (DO_{600nm} frente al tiempo) de las dos fermentaciones, mientras que la Figura 8 muestra las curvas de crecimiento neto (DO_{600nm} neta frente al tiempo).

Las curvas de crecimiento para DCFT26a y DCFT26b fueron muy similares a las de DCFT24b que se muestran en la Figura 2. Las células crecieron lentamente durante la fase de alimentación discontinua y alcanzaron una DO_{600nm} neta final de aproximadamente 3,5.

5 **Geles de SDS PAGE de muestras de fermentación:**

Se llevó a cabo un análisis de SDS PAGE (geles de Tris-glicina al 8%) de las muestras de sobrenadante para cada una de las dos fermentaciones (Figura 9 y Figura 10). Además, con el fin de obtener una mejor estimación de la cantidad de colagenasas, se llevó a cabo un gel de SDS PAGE semicuantitativa para la muestra del momento de la cosecha de DCFT26a (Figura 11) y DCFT26b (Figura 12).

En ambas fermentaciones, los niveles de colagenasas fueron similares a los de DCFT24b (Figura 3). El gel de SDS PAGE semicuantitativa muestra que se obtuvieron niveles muy similares a DCFT24b (entre 280 mg/l a 300 mg/l de colagenasa total) tanto para DCFT26a como para DCFT26b. El momento de cosecha del ciclo de fermentación de DCFT26a (Figura 11) fue ~ 142 mg/l para colagenasa I y ~ 132 mg/l para colagenasa II. El momento de cosecha del ciclo de fermentación de DCFT26b (Figura 12) fue ~ 147 mg/l para colagenasa I y ~ 158 mg/l para colagenasa II. Los niveles de clostripaína, como en el caso de DCFT24b, seguían siendo altos.

20 **Estudio de la etapa de precipitación con sulfato de amonio:**

Los resultados de estas fermentaciones indicaron que aunque los niveles de colagenasas eran altos usando la estrategia de alimentación discontinua, los niveles de clostripaína también eran significativamente altos. Por lo tanto, se estableció un estudio experimental a pequeña escala para investigar el efecto de la concentración de sulfato de amonio en las cantidades recuperadas de clostripaína y colagenasas en el sedimento precipitado del sobrenadante de fermentación filtrado.

Con el fin de evaluar la eficacia de la etapa de precipitación con sulfato de amonio, se cosecharon 6 x muestras de sobrenadante de 100 ml de la fermentación de DCFT26a. Estas muestras se precipitaron con 6 concentraciones diferentes de sulfato de amonio como se detalla en la siguiente tabla. Los sedimentos se resuspendieron en 3,3 ml de WFI y se dializaron frente a K_2HPO_4 100 mM (pH 6,7).

30 **Tabla 5** Concentraciones de sulfato de amonio que se utilizaron para precipitar muestras de sobrenadante de 100 ml de DCFT26a.

Porcentaje de saturación	Concentración de sulfato de amonio (g/L)
15%	100 g/l
22,5 %	150 g/l
30%	200 g/l
37,5 %	250 g/l
45 %	300 g/l
60 %	400 g/l

35 Las muestras postdializadas se analizaron entonces por análisis de SDS PAGE.

Figura 13: Muestra del momento de cosecha postdializada precipitada con 15% y 22,5%

40 Figura 14: Muestra del momento de cosecha postdializada precipitada con 30% y 37,5%

Figura 15: Muestra del momento de cosecha postdializada precipitada con 45% y 60%

45 Los geles muestran que en el caso en que el sulfato amónico utilizado se encontraba entre 15% y 45% de saturación, los niveles de colagenasas en las muestras postdializadas eran muy bajos. La recuperación en estos casos parecía ser menor que 5%.

En el caso en que se utilizó una saturación del 60% de sulfato amónico (400 g/l), los niveles de colagenasas en la muestra postdializada fueron muy altos (Figura 15). Comparando la intensidad de las bandas (muestra frente a referencias) se puede estimar que aproximadamente 70 mg/l para cada una de las colagenasas estaban presentes en la muestra postdializada. Esto sugiere una recuperación de aproximadamente 50 a 60%, ya que de acuerdo con el gel de semicuantificación para DCFT26a (Figura 11) hubo aproximadamente 130 mg/l de cada una de las colagenasas en la muestra del momento de cosecha.

55 Por tanto, la invención se refiere al uso de la receta de medios (por supuesto, las cantidades expuestas en la misma se aproximan) expuesta anteriormente en DCFT26b, y al uso de sulfato de amonio para precipitar

colagenasa en la que se añaden aproximadamente 400 g/litro de sulfato de amonio al medio que contiene colagenasa.

3^{er} conjunto de fermentaciones alimentadas discontinuas

5 Aquí, el objetivo principal fue evaluar la reproducibilidad de la estrategia de alimentación discontinua desarrollada. Se realizó una fermentación discontinua alimentada que fue una fermentación por duplicado de DCFT26b. Además, las etapas de sulfato de amonio/precipitación se investigaron con más detalle en comparación con el estudio a pequeña escala anterior. Más específicamente, el objetivo fue examinar el efecto de diversas concentraciones de sulfato de amonio, desde el 60% (400 g/l) hasta el 80% (530 g/l) sobre la recuperación de colagenasas y clostripaína en las muestras postprecipitadas/dializadas. Además, también se evaluaron dos métodos de tratamiento de las muestras de sobrenadante recolectadas, es decir, desplazamiento del pH y oxigenación del medio.

15 Curva de crecimiento:

El medio y la estrategia de alimentación discontinua usados fueron exactamente los mismos que DCFT26b. La Figura 16 muestra la curva de crecimiento (DO_{600nm} frente al tiempo) y la curva de crecimiento neto (DO_{600nm} neta frente al tiempo) de la fermentación. La curva de crecimiento fue muy similar a la de DCFT26b, lo que indica la buena reproducibilidad del procedimiento.

El análisis de SDS PAGE (geles de Tris-glicina al 8%) de las muestras de sobrenadante tomadas durante toda la fermentación indicó que los niveles de colagenasas y clostripaína eran muy similares a los de DCFT26b (gel de SDS PAGE no mostrado). Se realizó un gel de SDS PAGE semicuantitativo (gel de Tris-Glicina al 8%) para la muestra del momento de recogida (Figura 17). El gel sugiere que hay más de 120 mg/l de cada una de las colagenasas presentes, similar a los niveles observados en DCFT26b.

Precipitación con sulfato de amonio de las muestras de cosecha de fermentación:

30 Para evaluar la eficiencia de la etapa de precipitación con sulfato de amonio, se recogieron 7 x 500 ml de muestras de sobrenadante. Estos se precipitaron usando los seis métodos siguientes.

En todos los casos, los sedimentos se resuspendieron en 16,5 ml de WFI y se dializaron frente a 100 mM de K_2HPO_4 (pH 6,7), con la excepción del método 4, en el que el sedimento se resuspendió en 16,5 ml de 100 mM de K_2HPO_4 (pH 6) y se dializa frente al mismo amortiguador. Se realizaron entonces geles de SDS PAGE con el fin de estimar las cantidades de colagenasas en las muestras postdializadas y evaluar la recuperación de las etapas de precipitación/diálisis.

Los métodos para precipitación/diálisis seguidos son los siguientes:

1. 1 Precipitación con 400 g/l de sulfato de amonio añadido de una vez en la muestra de sobrenadante. Diálisis frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.
2. 2 Precipitación con 400 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 minutos) a la muestra de sobrenadante. Diálisis frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.
3. 3 Precipitación con 400 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 minutos) a la muestra de sobrenadante, que se oxigenizó previamente. Esto se realizó oxigenando durante aproximadamente 10 minutos 500 ml de cultivo celular recogido del fermentador. El cultivo se esterilizó después por filtración. El sedimento formado después de la precipitación con sulfato amónico se dializó frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.
4. 4 Precipitación con 400 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 min) a la muestra de sobrenadante, cuyo pH se cambió a pH 6 añadiendo HCl 5N. El sedimento formado después se dializó frente a 100 mM de K_2HPO_4 , pH 6.
5. 5 Precipitación con 440 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 minutos) a la muestra de sobrenadante. Diálisis frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.
6. 6 Precipitación con 480 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 minutos) a la muestra de sobrenadante. Diálisis frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.
7. 7 Precipitación con 520 g/l de sulfato de amonio añadido lentamente (aproximadamente 30 minutos) a la muestra de sobrenadante. Diálisis frente a 100 mM de K_2HPO_4 pH 6,7.

El sulfato de amonio no se disolvió completamente cuando se añadió a 480 g/l y 520 g/l en las muestras de sobrenadante, mientras que se disolvió completamente cuando se añadió a 400 g/l y 440 g/l.

Los resultados de la SDS PAGE indicaron que los diferentes niveles de sulfato de amonio usados para la etapa de precipitación (400 g/l, 440 g/l, 480 g/l, 520 g/l) o los otros métodos usados (oxigenación, desplazamiento de pH) no parecían tener un efecto obvio sobre las cantidades de colagenasas presentes en las muestras postdializadas. En todos los casos, la concentración de cada una de las colagenasas en las muestras postdializadas varió entre 50 mg/l y 60 mg/l. La Figura 18a muestra un gel de SDS PAGE representativo, tal como el de la muestra postdializada precipitada con 400 g/l de sulfato de amonio. Debido a que todos los geles fueron muy similares, los otros geles SDS PAGE no se presentan en este informe.

Teniendo en cuenta las concentraciones estimadas de colagenasas en la muestra del momento de cosecha (Figura 17) y en las muestras postdializadas, la recuperación de la colagenasa después de las etapas de precipitación/diálisis fue aproximadamente 50%. Para investigar si el valor de la recuperación del 50% era exacto, puesto que el error en la estimación de la concentración de colagenasa por gel de SDS es en general alto, se llevaron a cabo los siguientes geles de SDS PAGE.

Un gel de SDS PAGE de todos los sobrenadantes después de la centrifugación de las muestras precipitadas con sulfato de amonio (Figura 18a). El objetivo era evaluar si se pierde alguna cantidad de colagenasas en el sobrenadante.

Un gel de SDS PAGE en el que la muestra de sobrenadante del momento de cosecha y la muestra precipitada con sulfato de amonio postdializada (400 g/l) se diluyeron adecuadamente para contener cantidades iguales de colagenasas y se cargaron en el mismo gel (Figura 19).

Un gel de SDS PAGE en el que la muestra de sobrenadante del momento de cosecha y la muestra precipitada con sulfato de amonio postdializada (520 g/l) se diluyeron adecuadamente para contener cantidades iguales de colagenasas y se cargaron en el mismo gel (Figura 20).

Se puede ver en la Figura 18b que la cantidad de colagenasas presentes en los sobrenadantes después de la centrifugación de las muestras precipitadas con sulfato de amonio era muy baja. En la Figura 19 y la Figura 20, la cantidad de colagenasas después de las etapas de precipitación/diálisis pareció ser muy similar a la de la muestra de cosecha del sobrenadante. Por lo tanto, era probable que el valor de recuperación que se obtuvo al comparar los geles de SDS PAGE semicuantitativa del sobrenadante y de las muestras post-dializadas fuera realmente mayor.

Experimentos de fermentación de prueba de referencia con TSB/Proteosa derivada de animal

Se realizaron fermentaciones de las cepas 013 y 004 de *C. histolyticum* en los medios que contienen componentes derivados de animales. El objetivo era comparar la cepa 013 con la cepa 004, y evaluar el efecto de los componentes animales sobre el crecimiento celular, la expresión de colagenasa y sobre los niveles de contaminantes.

***C. histolyticum* 013:**

La cepa liofilizada se reconstituyó en PBS y se colocó en placas de agar TSB/Proteosa (30 g/l de TSB, 10 g/l de proteosa peptona, 12 g/l de agar. Las placas se incubaron en un recipiente anaeróbico en presencia de paquetes de gas anaeróbico. Se seleccionaron colonias individuales y se usaron para inocular 5 ml de medio TSB/Proteosa. Después de 15 horas de incubación a 37 °C, la DO_{600nm} del cultivo fue de aproximadamente 1,0 unidad. A continuación se mezclaron 5 ml de cultivo con 1 ml de solución estéril y se almacenaron por debajo de -70 °C.

Fermentaciones de PBFT58

Curvas de crecimiento:

Se llevaron a cabo dos fermentaciones discontinuas de 5 litros, de PBFT58c (cepa 004) y PBFT58d (cepa 013). La tabla 6 presenta la receta de los medios TSB/Proteosa utilizados. La Figura 21 muestra las curvas de crecimiento obtenidas (DO_{600nm} frente al tiempo).

Tabla 6 Receta para los medios de TSB/Proteosa

Componente	Concentración
Proteosa peptona	50 g/l
TSB	15 g/l

Componente	Concentración
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,08 g/l
KH ₂ PO ₄	1,92g/l
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l
Solución de vitaminas (filtrada esterilizada)	10ml/l

Se vio en la Figura 21 que la cepa 013 creció a una DO más alta que la cepa 004. En ambos casos, sin embargo, la DO_{600nm} final fue superior a 2,5, lo que indica que los medios derivados de animales soportaron un buen crecimiento para ambas cepas.

5

Se observó que la cepa 013 continuó creciendo lentamente hasta el momento de cosecha (20 horas) mientras que la cepa 004 creció hasta una DO_{600nm} neta de aproximadamente 2,7 y a continuación dejó de crecer. En comparación con las fermentaciones alimentadas discontinuas por lotes presentadas anteriormente, utilizando los medios no derivados de animales, la DO final obtenida utilizando los medios de TSB/Proteosa derivados de animales fue menor.

10

Análisis de SDS PAGE:

Los geles de SDS PAGE (geles de Tris-Glicina al 8%) de las muestras de sobrenadante tomadas a lo largo de las fermentaciones se muestran en la Figura 22 y la Figura 23.

15

No parece haber ninguna clostripaína en los sobrenadantes de la fermentación, especialmente en el caso de la cepa 013. Este fue un hallazgo muy importante ya que podría explicar el hecho de que el autor puede no haber tenido problemas o haber reducido problemas durante la purificación de las colagenasas. Por el contrario, se habían experimentados problemas significativos con la degradación de las colagenasas previamente durante el proceso de purificación. Esto podría atribuirse en parte a la presencia de clostripaína en la fermentación.

20

Para obtener una mejor estimación de la cantidad de colagenasas presentes en las fermentaciones, se llevó a cabo un gel de SDS PAGE semicuantitativa para las muestras del momento de cosecha (Figura 24 y Figura 25). Los geles sugieren que se produjo una menor cantidad de colagenasas en las fermentaciones discontinuas con los medios TSB/Proteosa (PBFT58c) en comparación con la fermentación alimentada discontinua con los medios vegetales (PBFT57). Esto podría atribuirse al hecho de que se obtuvieron densidades celulares más altas en el último caso (DO_{600nm} ~ 4 a DO_{600nm} ~ 2.7). La Tabla 7 resume los resultados de los geles semicuantitativos.

25

30 Tabla 7. Resultados de geles de SDS PAGE semicuantitativa para PBFT57 y PBFT58c,d

	PBFT57 (Libre de animales, cepa 004)	PBFT58c (Derivada de animales, cepa 004)	PBFT58d (Derivada de animales, cepa 013)
AUX I (mg/l)	132	88	59
AUX II (mg/l)	142	95	95
Total	274	183	154

Precipitación con sulfato de amonio de muestras de cosecha de fermentación:

35 Para cada fermentación, se precipitaron 2 x muestras de 500 ml del momento de cosecha con 400 g/l (60%) y 520 g/l (80%) de sulfato de amonio. Los sedimentos se resuspendieron en 16,5 ml de API y se dializaron frente a K₂HPO₄ 100 mM (pH 6,7). A continuación se realizó un análisis de SDS PAGE (geles de Tris-glicina al 8%) de las muestras post-dializadas (Figura 26 y Figura 27).

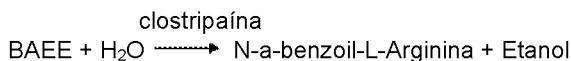
40 Los resultados de estos geles indicaron que los niveles de clostripaína, incluso en las muestras post-dializadas muy concentradas (carriles 6 y 7 de las Figuras 26 y 27) eran extremadamente bajos. Esto es más evidente en el caso de la cepa 013 en comparación con la cepa 004.

45 Por lo tanto, aquí se describen composiciones de colagenasa que están libres de clostripaína, tales como las producidas por los procesos de fermentación descritos aquí.

Medida de la actividad de clostripaína:

Con el fin de investigar más a fondo el papel de clostripaína, se estableció un ensayo enzimático para medir la actividad de clostripaína de muestras post dializadas. Se utilizó el siguiente método:

Ensayo enzimático de clostripaína:



BAEE = Éster Etilico de N-a-benzoil-L-arginina

Condiciones: T = 25 °C, pH = 7,6, A_{253nm}, Trayectoria de la luz = 1 cm

Método: Determinación de la Velocidad Espectrofotométrica Continua

Definición de la unidad: Una unidad hidrolizará 1,0 μmol de BAEE por minuto a pH 7,6 a 25 °C en presencia de DTT 2,5 mM.

Análisis de muestras postdializadas para determinar la actividad de clostripaína:

El ensayo de la actividad de clostripaína se usó para analizar las muestras post-dializadas de las fermentaciones con el TSB/Proteosa (PBFT58) y la fermentación alimentada discontinua basada en vegetales (PBFT57). La tabla 8 resume los resultados.

Los resultados demuestran que hubo muy poca actividad de clostripaína en el caso de las fermentaciones en TSB/Proteosa. En contraste, la actividad de clostripaína en el caso de la fermentación alimentada discontinua de PBFT58 fue muy alta.

Tabla 8 Actividades enzimáticas de muestras post-dializadas

	PBFT57 (Libre de animales, cepa 004)	PBFT58c (Derivada de animales, cepa 004)	PBFT58d (Derivada de animales, cepa 013)
Actividad de clostripaína (U/ml)	56,4 *	1,0 *	0,1 *
Actividad específica de clostripaína (U por mg de colagenasa total)	205,8	5,5	0,7

* Actividad de clostripaína determinada en la muestra precipitada/postdializada

Investigación de peptonas alternativas

Experimentos de cribado en matraz de agitación:

En este trabajo se utilizaron varias peptonas vegetales como alternativas a la fitona peptona. El objetivo fue evaluar su efecto sobre los niveles de expresión de las colagenasas y de la clostripaína. Todas las peptonas probadas derivan de fuentes vegetales y son comercializadas por Sigma.

El procedimiento experimental utilizado se describe en la Figura 28. Las recetas de los medios se detallan en la Tabla 9, mientras que se muestra una lista de las peptonas utilizadas en la Tabla 10. También se realizó un matraz de agitación de control, que contenía fitona peptona. En todos los casos, se utilizaron 50 g/l de extracto de levadura y 100 g/l de cada peptona en un esfuerzo por imitar las concentraciones de estos componentes en el momento de cosecha de la fermentación alimentada discontinua desarrollada (véase la Tabla 4).

Tabla 9 Composición de los medios utilizados en el experimento matraz de agitación. Todos los medios se esterilizaron por filtración.

Medios vegetales	
Componente	Concentración
Peptona alternativa	100 g/l
Extracto de levadura	50 g/l
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l

Medios vegetales	
Componente	Concentración
NaCl	2,5 g/l
Magnesio	0,08 g/l
Solución de vitaminas	10ml/l
Glucosa	0,9 g/l

Los matraces de agitación se incubaron durante 18 horas. Los cultivos se analizaron para determinar la DO_{600nm} y los recuentos de células viables. Los cultivos se filtraron, y los sobrenadantes se analizaron mediante SDS PAGE. Los resultados de las medidas de DO_{600nm} y los recuentos de células viables se resumen en la Tabla 10.

La mayoría de las peptonas vegetales dieron como resultado valores netos más altos de DO en comparación con la fitona peptona. Sin embargo, los valores de DO no se correlacionaron con los recuentos de células viables. Esto podría atribuirse en parte a la variabilidad del método de recuento de células viables o al hecho de que las células ya habían comenzado a lisarse antes del momento de cosecha preseleccionado (18 horas).

De forma interesante, el gel de SDS-PAGE indicó que no había expresión de colagenasa (gel no mostrado) en todos los matraces, incluyendo el de control (fitona peptona). Una posible razón para esto podría ser el hecho de que las concentraciones de la fitona peptona y del extracto de levadura utilizados fueron muy altas y, como resultado, reprimieron la expresión de colagenasas.

Tabla 10 Resultados 1^{er} experimento de análisis

Tipo de peptona	DO_{600nm} neta después de 18 h de crecimiento	UFC/ml
Fitona peptona (control)	2,65	$1,2 \times 10^9$
Proteasa peptona (vegetal)	2,58	$7,4 \times 10^8$
Triptona (vegetal)	3,05	$4,8 \times 10^8$
Extracto vegetal	3,22	$1,0 \times 10^9$
Extracto vegetal 1	3,11	$9,6 \times 10^9$
Extracto vegetal 2	3,05	$7,8 \times 10^9$
Hidrolizado vegetal 2	3,01	$8,4 \times 10^9$

Fermentaciones alimentadas discontinuas usando peptonas alternativas - DCFT27a,b:

Basándose en la información de los experimentos en matraces de agitación anteriores de que no se observó expresión de colagenasas, se decidió evaluar las peptonas alternativas utilizando la estrategia de alimentación discontinua desarrollada.

Se realizaron dos fermentaciones alimentadas discontinuas, DCFT27a (extracto vegetal 2) y DCFT27b (hidrolizado vegetal 2). En ambas fermentaciones se utilizó la estrategia de alimentación discontinua desarrollada para los medios que contienen fitona peptona. La Tabla 11 describe las recetas de los medios, mientras que en la Figura 29, la estrategia utilizada.

Tabla 11 Receta de medios para fermentaciones alimentadas discontinuas de DCFT27a y DCFT27b

Componente	DCFT27a,b		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Peptona alternativa	60 g/l	151,4 g/l	100 g/l
Extracto de levadura	20 g/l	127,1 g/l	50 g/l
Glucosa	7,5 g/l	17,8 g/l	10 g/l
		Filtrado esterilizado	
KH_2PO_4	1,92 g/l		
K_2HPO_4	1,25 g/l		
Na_2HPO_4	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		

Componente	DCFT27a,b		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10ml/l		
Volumen	3,6 l	1,4 l	~ 5L

Curvas de crecimiento:

5 Las curvas de crecimiento (DO_{600nm} neta frente al tiempo) para DCFT27a y DCFT27b se muestran en la Figura 30. En ambas fermentaciones, las células crecieron a una DO_{600nm} ligeramente superior en comparación con los medios que contienen fitona peptona (fermentación de PBFT57, Figura 16). Esto estaba de acuerdo con los recuentos de células viables (aproximadamente 2×10^9 UFC/ml para DCFT27a, b en comparación con $1,5 \times 10^9$ UFC/ml para PBFT57).

10 **Geles de SDS PAGE:**

Al igual que con los experimentos en matraz agitado, el análisis de SDS PAGE indicó que no había expresión de colagenasas tanto en DCFT27a como en DCFT27b (geles no mostrados).

15 Esto podría atribuirse al hecho de que los medios, que consisten en altas cantidades de peptona, soportan la expresión de colagenasas cuando se usa fitona peptona, pero son demasiado ricos cuando se usa una peptona alternativa y, por lo tanto, reprimen la expresión de cualquier metabolito, incluyendo colagenasa y clostripaina. Parece que las células experimentan condiciones de crecimiento cómodas en los medios que contienen las peptonas alternativas y no necesitan producir ninguna proteasa.

20 **Fermentaciones discontinuas utilizando peptonas alternativas - PBFT59a,b,c:**

Los resultados de las fermentaciones alimentadas discontinuas de DCFT27a y DCFT27b, llevaron a un trabajo adicional para investigar tres peptonas alternativas adicionales, aunque, utilizando concentraciones más bajas que las utilizadas anteriormente.

Se realizaron tres fermentaciones discontinuas de 5 l, PBFT59a (triptona vegetal), PBFT59b (extracto vegetal) y PBFT59c (extracto vegetal N.º 1). Las fermentaciones se cosecharon después de 18 horas.

30 Todas las peptonas se usaron a concentraciones de 50 g/l en un esfuerzo por imitar la concentración de la proteosa peptona en los medios animales (proteosa/peptona) y la concentración de fitona peptona que se usó previamente. La receta de los medios se muestra en la Tabla 12.

35 Tabla12 Receta de medios y estrategia de fermentación para fermentaciones de 5 l de PBFT59a, b, c

Componente	Concentración
Peptona alternativa	50 g/l
Extracto de levadura	8,5 g/l
Glucosa	5 g/l
KH_2PO_4	1,92 g/l
K_2HPO_4	1,25 g/l
Na_2HPO_4	3,5 g/l
NaCl	2,5 g/l
Magnesio	0,08 g/l
Solución de vitaminas	10ml/l
Volumen	5 l

Curvas de crecimiento:

40 Las curvas de crecimiento obtenidas de las fermentaciones de PBFT59a,b,c se muestran en la Figura 31. En todos los casos, las células crecieron a una DO_{600nm} más baja (entre 1,8 y 2,8) en comparación con las fermentaciones alimentadas discontinuas de DCFT27. Esto también estuvo de acuerdo con los recuentos de células viables (entre $0,7 \times 10^9$ UFC/ml y $1,2 \times 10^9$ UFC/ml para PBFT59a,b,c en comparación con 2×10^9 UFC/ml para DCFT27a,b). En

los medios que contenían triptona, las células demostraron la tasa de crecimiento más lenta y alcanzaron la densidad celular más baja después de 18 horas.

Geles de SDS PAGE:

5 En cuanto al experimento del matraz agitado y las fermentaciones en lotes alimentados con DCFT27a,b, no se observó expresión de colagenasa en los geles de SDS PAGE (geles no mostrados).

10 Estos resultados muestran que las peptonas alternativas, aunque apoyan el crecimiento celular, no permiten la expresión de colagenasas. Como se sugirió anteriormente, esto podría deberse al hecho de que estas peptonas son muy ricas en nutrientes, por ejemplo, aminoácidos libres y péptidos pequeños.

4° conjunto de fermentaciones alimentadas discontinuas- DCFT27d

15 Como los resultados de los experimentos que utilizaron las peptonas vegetales alternativas no tuvieron éxito, el siguiente objetivo de este trabajo fue investigar la posibilidad de disminuir los niveles de clostripaína en la fermentación alimentada discontinua desarrollada utilizando los medios de fitona peptona. Como se describe previamente, la clostripaína probablemente estaba causando la degradación de las colagenasas durante el proceso de purificación.

20 Se llevó a cabo una fermentación alimentada discontinua utilizando los medios de fitona peptona convencionales complementados con tres aminoácidos, es decir, glutamina, triptófano y asparagina. Esta fermentación se realizó porque las concentraciones de estos aminoácidos en particular eran más bajas en la fitona peptona en comparación con los medios de TSB/proteosa de animales, según la composición de aminoácidos de estos componentes, proporcionada por los fabricantes.

25 El objetivo aquí fue investigar si la adición de estos aminoácidos podría reducir cualquier limitación de nutrientes que pueda ser un factor contribuyente para la expresión de clostripaína. La receta de los medios se muestra en la Tabla 13. La estrategia de fermentación utilizada fue la estrategia de lote alimentado estándar utilizada para las fermentaciones DCFT26 y PBFT57 (ver Figura 6).

Tabla 13 Receta de medios para fermentación alimentada discontinua de DCFT27d

Componente	DCFT27d		
	Fase discontinua	Alimentación	Concentraciones en el momento de cosecha
Fitona Peptona	80 g/l	151,4 g/l	100g/l
Extracto de levadura	20 g/l	127,1 g/l	50 g/l
Glucosa	7,5 g/l	17,8 g/l	10 g/l
Aminoácidos		Filtrado esterilizado	
Glutamina	2,8 g/l		
Triptofano	0,35 g/l		
Asparginina	0,18 g/l		
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l		
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l		
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l		
NaCl	2,5 g/l		
Magnesio	0,08 g/l		
Solución de vitaminas	10ml/l		
Volumen	3,6 l	1,4 l	~5L

35 **Curva de crecimiento:**

Las curvas de crecimiento obtenidas de la fermentación de DCFT27d se muestran en la Figura 32. El perfil de crecimiento obtenido fue muy similar al obtenido para la fermentación alimentada discontinua convencional en ausencia de aminoácidos (DCFT26b y PBFT57) mostrada anteriormente.

40 **Geles de SDSPAGE:**

La Figura 33a muestra el gel SDS PAGE de las muestras de sobrenadante tomadas durante la fermentación. El nivel de colagenasas es similar al observado para la fermentación alimentada discontinua convencional (véase la Figura 10 para el gel de SDS PAGE de DCFT26b). Aunque clostripaína sigue presente en la fermentación, parecía que su nivel era más bajo que en DCFT26b.

Para seguir investigando esto, la actividad de clostripaína de la muestra del momento de cosecha post-dializada se estimó utilizando el ensayo de la actividad de la clostripaína. Además, también se estimó la actividad de la clostripaína de la muestra del momento de cosecha post-dializada tomada del lote de liofilización de 20 l. Debido a que este lote particular se purificó sin mostrar una degradación significativa de la colagenasa, el conocimiento de su actividad de clostripaína sería informativo. La Tabla 14 resume las actividades enzimáticas de las muestras post-dializadas. También incluye las actividades enzimáticas para la fermentación alimentada discontinua convencional de PBFT57 y en TSB/proteosa peptona de animales presentada en la Tabla 8, con fines comparativos.

Tabla 14 Actividades enzimáticas de muestras post-dializadas

	PBFT57 alimentado discontinuo estándar	DCFT27d alimentado discontinuo aminoácidos más	Lote de liofilización de 20 l	PBFT58c de TSB/Proteosa de animales
Actividad de clostripaína (U/ml)	56,4	15,2	16,6	1,0
Actividad específica de clostripaína (U por mg de colagenasa total)	205,8	55,3	184,4	5,5

Los resultados de DCFT27d indican que la adición de los aminoácidos reduce la actividad de clostripaína producida por la cepa. La relación de clostripaína a colagenasa es aproximadamente cuatro veces menor en la fermentación suplementada con aminoácidos en comparación con la fermentación alimentada discontinua de control. La relación de clostripaína frente a colagenasa en la fermentación derivada de animales fue diez veces más baja que la fermentación alimentada discontinua suplementada con aminoácidos. Es posible que la reducción de la actividad de clostripaína pueda dar lugar a una reducción significativa en la degradación de colagenasas durante la purificación.

Se realizaron una serie de fermentaciones de 5 litros para evaluar varias estrategias de fermentación alimentada discontinua. Las estrategias se evaluaron en función de su rendimiento de colagenasa, la cantidad de contaminantes y la escalabilidad. Basándose en estos resultados, se identificó una estrategia óptima de alimentación discontinua que dio como resultado una productividad de las colagenasas totales de aproximadamente 280 mg/l. La estrategia de fermentación se modificó incrementando ligeramente la concentración de medios discontinuos y reduciendo la concentración de medios alimentados para mejorar su escalabilidad. Este cambio en la estrategia de fermentación no tuvo ningún efecto sobre la productividad o los niveles de contaminantes.

El segundo objetivo fue optimizar la etapa de recuperación primaria de las colagenasas. La optimización de esta etapa implicó una mejora en el rendimiento de la etapa del proceso o una reducción en la cantidad de contaminantes recuperados o un aumento en la escalabilidad. Se evaluó un intervalo de concentraciones de sulfato de amonio de 100 a 520 g/l. También se evaluó el efecto de disminuir el pH a 6,0 y de oxigenar los medios. Todas las concentraciones de sulfato de amonio por debajo de 400 g/l mostraron muy bajas recuperaciones de colagenasa. No se observaron diferencias en la recuperación de colagenasa o clostripaína en ninguna de las concentraciones de sulfato de amonio entre 400 y 520 g/l. El sedimento de la precipitación de 400 g/l fue el más fácil de resuspender y, por lo tanto, esta concentración se definió como el nivel óptimo.

Se llevó a cabo un experimento de análisis comparativo para determinar y comparar el crecimiento y la producción de colagenasas y clostripaína en un medio derivado de animales con las cepas de *C. histolyticum* 013 y 004. La receta de medios derivados de animales se tomó de los medios de fermentación del Proceso 1, utilizando TSB y proteasa peptona. Este experimento también permitió una comparación de la cepa 004 cultivada en medios animales y no animales. Los resultados del análisis de SDS-PAGE mostraron que cantidades mucho menores de clostripaína de *C. histolyticum* crecieron en los medios derivados de animales. Estos resultados se confirmaron utilizando un ensayo enzimático para determinar la actividad de clostripaína. El ensayo demostró una reducción significativa en la actividad de clostripaína en fermentaciones utilizando los medios derivados de animales. Cuando se compararon las dos cepas, 004 mostró una mayor actividad de clostripaína que 013.

Las selecciones de fuentes de nitrógeno alternativas se evaluaron por su capacidad para reemplazar la Fitona peptona en la estrategia de fermentación alimentada discontinua. Estas peptonas fueron el Extracto Vegetal N.º2

(Sigma, 49869) y el Hidrolizado Vegetal N.º 2 (Sigma, 07436). El *C. histolyticum* creció extremadamente bien en las peptonas vegetales, alcanzando densidades ópticas (600 nm) de 4 a 5 unidades. El análisis de SDS-PAGE de estas fermentaciones no mostró expresión de colagenasa ni clostripaína. Debido al exuberante crecimiento celular observado en estas peptonas, se pensó que la concentración de una fuente de nitrógeno compleja era demasiado alta, dando como resultado una inhibición de la expresión de proteasas. Por lo tanto, se llevó a cabo un segundo conjunto de fermentaciones utilizando las peptonas alternativas a 50 g/l en una estrategia discontinua. La Triptona vegetal (Sigma, 16922) Extracto vegetal (Sigma, 05138) y Extracto vegetal N.º 1 (Sigma, 04316) se usaron como peptonas alternativas para estos experimentos. Cuando las fermentaciones se analizaron por SDS-PAGE, no se observó expresión de colagenasa o clostripaína. Una fermentación alimentada discontinua con fitona peptona se complementó con tres aminoácidos, glutamina, triptófano y asparagina. Estos aminoácidos se identificaron como presentes en cantidades más bajas en los medios no animales. El perfil de crecimiento de la fermentación fue muy similar al de la fermentación alimentada discontinua sin suplementación de aminoácidos. El análisis de SDS-PAGE mostró un rendimiento similar de colagenasa pero un nivel ligeramente más bajo de clostripaína. El ensayo de clostripaína mostró una actividad reducida en el amino suplementado cuando se comparó con el control de la fermentación alimentada discontinua. La reducción en la actividad de clostripaína aunque todavía era significativa no fue tan grande como la diferencia entre los medios animales y no animales.

Materiales y métodos:

20 Medios de inóculo para fermentaciones utilizando medios vegetales

A lo largo de este trabajo de desarrollo se utilizaron las siguientes recetas para los medios de inóculo.

25 Medios de inóculo - Vegetal

Componente	Concentración
Peptona vegetal	50 g/l
Extracto de levadura	8,5 g/l
Glucosa	0,9 g/l
KH ₂ PO ₄	1,92 g/l
K ₂ HPO ₄	1,25 g/l
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/l
NaCl	2,5 g/l
Magnesio	0,08 g/l
Solución de vitaminas	10ml/l

El medio se esterilizó por filtración

30 Procedimiento de inoculación

Se descongeló un vial del banco de células interno y se utilizaron 0,025 ml para inocular 5 ml del medio de inóculo en un universal de 30 ml. El cultivo de 5 ml se incubó a 37 °C en un recipiente anaeróbico en presencia de generadores de gas anaeróbicos. Después de aproximadamente 13 a 15 horas de incubación, se usaron 4 ml del cultivo para inocular 200 ml del medio de inóculo en un matraz de 500 ml. Como anteriormente, el matraz se colocó en un recipiente anaeróbico en presencia de generadores de gas anaeróbicos. Después de aproximadamente 13 a 15 horas de incubación a 37 °C y 75 rpm, se utilizó el contenido total del matraz para inocular el fermentador.

El pH y la temperatura de los fermentadores se controlaron a 7,0 y 37 °C, respectivamente. El caudal de nitrógeno se ajustó a 1 l/min (~ 0,2 vvm) y la velocidad del agitador a 100 rpm. Se tomó una muestra del fermentador a intervalos de tiempo regulares para medidas de DO_{600nm} y recuentos de células viables. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Los filtrados se almacenaron a -20 °C y se congelaron a -20 °C para el análisis de SDS PAGE. La Figura 33b muestra un diagrama esquemático del procedimiento de inoculación.

Se establece a continuación una receta preferida para la fermentación alimentada discontinua.

45

Componente	Cantidad
Fase discontinua	
KH ₂ PO ₄	2,91 g/l

Componente	Cantidad
K ₂ HPO ₄	1,89 g/l
Na ₂ HPO ₄	5,30 g/l
NaCl	3,79 g/l
Fitona	65,45 g/l
Extracto de Levadura Bacto	21,80 g/l
MgSO ₄	0,12 g/l
FeSO ₄ × 7H ₂ O	18,18 mg/l
Riboflavina	0,758 mg/l
Niacina	1,52 mg/l
Pantotenato de calcio	1,52 mg/l
Ácido pimélico	1,52 mg/l
Piridoxina	1,52 mg/l
Tiamina	1,52 mg/l
Volumen para fermentación de 5 l	3,3 l
Fase alimentada discontinua	
Glucosa	17,86 g/l
Fitona	151,43 g/l
Extracto de Levadura Bacto	127,14 g/l
Volumen para fermentación de 5 l	1,4 l

También es deseable ampliar el proceso de fermentación adicionalmente sin restar valor a la calidad o los rendimientos de los productos de colagenasa. Por lo tanto, la divulgación se refiere adicionalmente a un proceso de alimentación discontinua de aproximadamente 200 litros, como se describe en el diagrama de flujo en la Figura 33c.

Método de recuento de células viables

Las muestras tomadas de los matraces de agitación se diluyeron con un factor de 10⁻⁴ a 10⁻⁷ y se colocaron en placas de agar TB. Las placas se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 48 horas en un recipiente Genbox. Se utilizó un paquete de generador de gas anaeróbico para crear condiciones anaeróbicas dentro del recipiente. A continuación se contó el número de colonias.

Precipitación en sulfato de amonio:

Materiales: Centrífuga Sorvall Evolution

Productos químicos: Sulfato de amonio, grado GPR (BDH)

Las muestras de sobrenadante (100 ml a 500 ml) se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm. Dependiendo del experimento, se agregaron varias cantidades de sulfato de amonio (del 15% al 80% de saturación). La solución se mezcló lentamente en un agitador magnético durante aproximadamente 15 minutos, hasta que todo el sulfato de amonio se hubo disuelto. A continuación se mantuvo sin mezclar durante ~ 3,5 horas a + 2-8 °C. Después de la etapa de espera, se formó una cantidad significativa de precipitado. La solución se centrifugó a continuación a 7.200 x g durante 20 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el pellet se almacenó a -20°C.

Diálisis

Materiales: Sistema tubular de diálisis SnakeSkin de MWCO de 10kDa (68100, Pierce)

Agitador magnético

Productos químicos: Ortofosfato de dihidrógeno de potasio AnalaR (BDH)

Agua para inyección (API)

Los sedimentos obtenidos de una muestra de 100 ml de sulfato de amonio se resuspendieron en 3,3 ml de API. El sedimento reconstituido se transfirió a un tubo de diálisis SnakeSkin de 10 kDa MWCO humedecido previamente, y se dializó contra K_2HPO_4 100 mM (pH 6,7) durante ~ 12 a 16 horas a 2-8 °C. A continuación se cambió el API y se continuó la diálisis durante 2 a 4 horas. El material dializado se recuperó y se determinó el volumen. La muestra post-dializada se almacenó a -20 °C.

Análisis de SDS-PAGE (geles de Tris-glicina al 8%)

10

Materiales: Xcell SureLock Mini-Cell:

Productos químicos:

15

Estándares SDS-PAGE de alto peso molecular (161-0303, Bio Rad)

Geles Novex Tris-glicina al 8 %, 1,5 mm, 10 pocillos (EC6018BOX, Invitrogen)

20

Geles Novex Tris-glicina al 8 %, 1,5 mm, 15 pocillos (EC60185BOX, Invitrogen)

Amortiguador de ejecución de SDS Tris-Glicina de Novex (10x) (LC2675, Invitrogen)

Amortiguador de muestra Novex Tris-Glicina SDS (2x) (LC2676, Invitrogen)

25

Agente reductor de muestras NuPAGE (10x) (NP0009, Invitrogen)

Kit de tinción de azul Coloidal (LC6025, Invitrogen)

30

Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético Analar R (BDH)

35

Las muestras se prepararon para la SDS-PAGE reductora mediante la adición de 10 µl de muestra a 10 µl de amortiguador de muestra (2x), 2,5 µl de agente reductor (10x) y 2 µl de EDTA 0,1M (para lograr una concentración final de 10 mM). El marcador de alto peso molecular (HMW) se preparó agregando 10 µl de solución madre concentrada a 80 µl de agente reductor (10x), 310 µl de API y 400 µl de amortiguador de muestra (2x). El HMW diluido convencional se calentó a continuación a 95 °C durante 5 minutos antes de hacer alícuotas y el almacenamiento a -20 °C para su uso en geles posteriores. Las muestras (15 µl) que contenían colagenasas se procesaron directamente (es decir, sin tratamiento térmico previo) en geles de Tris-Glicina al 8% utilizando amortiguador de ejecución de Tris-glicina a 130 V durante ~1 hora y 50 minutos. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con un reactivo de tinción azul coloidal según las instrucciones del fabricante.

40

Proceso de purificación

Resumen del método para el proceso de purificación de 5 l:

Etapa 1.	Precipitación con sulfato de amonio del sobrenadante de los medios de cultivo (proteína segregada).	
	Reconstitución y diálisis en fosfato de potasio 0,1M, arginina 0,1 M pH 6,7.	
Etapa 2.	Cromatografía de hidroxapatita (en presencia de 200 µM de leupeptina)	
	Eluir con gradiente de 0-100% de fosfato de potasio 0,264 M pH 6,7 sobre 4 CV.	
	Los picos de elución tardía del grupo 2 donde $A_{280} > A_{260}$, carga directa sobre TMAE	
Etapa 3.	Intercambio iónico Fractogel TMAE (en presencia de 200 µM de leupeptina)	
	Eliminación de ácidos nucleicos (también se puede utilizar un filtro Pall Mustang Q)	
	Recoger y agrupar el flujo no consolidado.	
Etapa 4.	Diálisis en 10 mM Tris pH 8,0	
Etapa 5.	Intercambio iónico Q Sepharose HP (en presencia de 200 µM de leupeptina)	
	Separar AUXI de AUXII	
	Eluir con un gradiente del 0-40% de Tris 10 mM, $CaCl_2$ 3 mM, NaCl 360 mM a pH 8,0 sobre 20 VC	
	2 picos recogidos:	Pico 1 = AUXII
	Pico 2 = AUXI	

La arginina se agrega a 0,1M a las fracciones que contienen AUXI y AUXII.	
Etapa 6.	Grupos de AUXI y AUXII concentrados mediante celda agitada presurizada
Etapa 7.	Filtración de gel Superdex 75
	Eliminación de clostripaina y gelatinasa de AUXI y AUXII
	AUXI y AUXII se ejecutan individualmente en columnas separadas.
	Muestras cargadas al 5% de VC
	Amortiguador: Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, NaCl 150 mM, Arginina 0,1 M pH 8
Etapa 8.	La AUXI y la AUXII se agrupan y se concentran individualmente, se diafiltran en agua y a continuación, se agrupan para formar el fármaco final.

Detalles de la columna:

Tabla 15. Especificaciones de columna para procesos de 5 I

5

Medios	Volumen (ml)	Columna	Altura del lecho (cm)	Asimetría	Placas/metro
HA	300	XK50/30	15	1,85	9227
Fractogel TMAE	58	XK26/40	10	1,02	5368
Q Sepharose	100	XK50/20	5	1,35	19367
Superdex 75 -1	880	XK50/60	45	1,24	18644
Superdex 75 -2	880	XK50/60	45	1,85	13576

Empaquetamiento de las columnas

10

Las columnas se empaquetaron según las instrucciones del fabricante cuando fue posible.

Columna TMAE - no se encontraron problemas.

15

Q Sepharose y Superdex 75 - se encontraron dificultades en el empaquetamiento para corregir la presión debido al tamaño de la columna. Sin embargo, las columnas pudieron ejecutarse a la presión recomendada.

HA - empaquetada como una suspensión al 50% y se ejecuta a 10 ml/min.

20

Rendimientos/recuperaciones del proceso de 5 I:

Tabla 16: Purificación de AS ppt a Q-Sepharose IEX

Los resultados de las etapas de cromatografía se muestran en negrita.					
Etapa del proceso	Concentración de proteína (mg/ml)	Método	Volumen (g)	Proteína total (mg)	Rendimiento de la etapa (%)
Post AS pp. y diálisis	1,12	Bradford	346,45	388,02	-
Pre HA (post-adición de leupeptina)	1,08	Bradford	359,85	388,64	-
Post HA	0,51	Bradford	646,85	329,89	84,88
Pre-TMAE	0,51	Bradford	646,85	329,89	-
Post-TMAE	0,51	UV	647,2	330,07	100,05
Post diálisis	0,404	UV	715,0	288,86	87,51
Pre-IEX	0,388	UV	744,0	288,67	-
Post IEX ABC I (pico 2)	0,454	UV	188,1	85,40	29,58

Los resultados de las etapas de cromatografía se muestran en negrita.

Etapa del proceso	Concentración de proteína (mg/ml)	Método	Volumen (g)	Proteína total (mg)	Rendimiento de la etapa (%)
Post IEX ABC II (pico 1)	0,536	UV	220,7	118,29	40,98

Tabla 17: Purificación de Q-Sepharose IEX a post Superdex 75 GPC.

Etapa del proceso	Concentración de proteína (mg/ml)	Método	Volumen (g)	Proteína total (mg)	Rendimiento de la etapa (%)
ABC I de célula pre agitada	0,454	UV	188,1	85,40	-
ABC I de célula post agitada	1,901	UV	41,6	79,08	92,6
Pre GPC ABC I	1,901	UV	40,6	77,18	-
Post GPC ABC I	1,12	UV	60,0	67,2	87,07
ABC II de célula pre agitada	0,536	UV	220,7	118,29	-
ABC II de célula post agitada	2,76	UV	45,5	125,58	106,16
Pre GPC ABC II	2,46	UV	44,0	108,24	-
Post GPC ABC II	1,192	UV	59,3	70,68	65,3

- 5 Los rendimientos de un proceso de 5 l son aproximadamente 60-75 mg cada una de ABCI y ABCII. Para una mayor escala, dependiendo de la fermentación, se podrían esperar rendimientos de 250-300 mg para 20 l y de 2500-3000 mg para 200 l.

Etapas individuales de cromatografía de escala 5 l:

10

Cromatografía de hidroxapatita

Tamaño de columna:	2 x 300 ml en XK50/30 (15 cm de altura de lecho cada una)
Amortiguador A:	Fosfato de potasio 0,1 M, leupeptina 200 µM, pH 6,7
Amortiguador B:	Fosfato de potasio 0,264 M, leupeptina 200 µM, pH 6,7
Muestra:	~ 350 ml (en fosfato de potasio 0,1M, arginina 0,1M a pH 6,7) cargado a <1,0 mg/ml de medio*
Caudal:	9,8 ml/min
Elución:	0-100% de B sobre 4 VC

- 15 La Figura 34 muestra un cromatograma después de la hidroxapatita con una carga de 1,0 mg/l de medios, en donde se produce una pérdida considerable de resolución y una degradación de la diana.

Intercambio aniónico en Fractogel TMAE

Tamaño de columna:	58 ml en XK26/20 (10 cm de altura de lecho)
Amortiguador A:	Fosfato de potasio 10 mM, NaCl 0,2 M, leupeptina 200 µM, pH 6,7
Amortiguador B:	Fosfato de potasio 10 mM, NaCl 2 M, pH 6,7
Muestra:	~650 ml a 0,5 mg/ml (en fosfato de potasio pH 6,7, directamente de la columna HA) cargado a ~5,5 mg/ml de medio
Caudal:	8,8 ml/min
Elución:	(100% de B para eluir el ácido nucleico)

- 20 La Figura 35 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico en fractogel TMAE. La fracción no unida se agrupó para dar ~ 650 ml a 0,5 mg/ml. Dializado en Tris 10 mM a pH 8.

La Figura 36 muestra un gel de SDS-PAGE de de material Pre HA, post HA y Post TMAE a partir del proceso de escala de 5 l. El gel se tiñe con azul Coloidal.

5 **Intercambio aniónico con Qsepharose HP con gradiente de elución original**

Tamaño de columna:	100 ml en XK50/20 (5,0 cm de altura de lecho)
Amortiguador A:	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, leupeptina 200 µM, pH8.0
Amortiguador B:	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, NaCl 360 mM, leupeptina 200 µM, pH8.0
Muestra:	~ 650 ml a 0,5 mg/ml (en Tris 10 mM, a pH 8,0 + leupeptina 200 µM) cargados a <u>~3,0mg/ml de medio</u>
Caudal:	18,0 ml/min
Elución:	0-40% de B sobre 20 VC

10 La Figura 37 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico con Q Sepharose HP con gradiente de elución original. La arginina se añade a 0,1M a las fracciones que contienen ABCI y ABCII. La fracción del pico 1 (ABCII) se reunió para dar ~ 220 ml a 0,55 mg/ml, que se concentró por célula agitada para dar ~ 45 ml a 2,8 mg/ml. Las fracciones del pico 2 (ABCI, excluyendo el desnivel de gelatinasa) se agruparon para dar ~ 190 ml a 0,45 mg/ml, que se concentró por célula agitada para dar ~ 42 ml a 2 mg/ml.

15 La Figura 38 muestra un gel de SDS-PAGE de cromatografía IEX con Q-Sepharose de material post-TMAE ejecutado en presencia de leupeptina para el Pico 1 (ABCII). El gel se tiñe con azul Coloidal.

La Figura 39 muestra un gel de SDS-PAGE de cromatografía IEX con Q-Sepharose de material post-TMAE ejecutado en presencia de leupeptina para el Pico 2 (ABCI). El gel se tiñe con azul Coloidal.

20 **Intercambio aniónico Q Sepharose HP con gradiente modificado**

Prueba a pequeña escala de la adición de NaCl al amortiguador A y utilizando un gradiente más pronunciado/más rápido. La muestra procedía de un proceso de 1/3 5 l, post TMAE, previamente congelado (-20 °C).

Tamaño de columna:	1 ml
Amortiguador A:	Tris 10 mM, NaCl 30 mM, CaCl ₂ 3 mM, leupeptina 200 µM, pH8.0
Amortiguador B:	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, NaCl 360 mM, leupeptina 200 µM, pH8.0
Muestra:	3 mg post TMAE, post diálisis en Tris 10 mM, NaCl 30 mM, leupeptina 200 µM, pH 8,0. Cargado a <u>3 mg/ml de medio</u>
Gradiente:	0-25 % de B sobre 2 VC, 25 % de B para 2 VC, 25-40 % de B sobre 7,5 VC

25 La Figura 40 ilustra un cromatograma después de un intercambio aniónico Q Sepharose HP con gradiente de elución modificado. Se observa una buena separación de ABCI y ABCII. La segunda parte del gradiente se puede hacer más pronunciada para agudizar el pico ABCI. La mejora del pico también se puede realizar utilizando 5 ml de VC cargados a 3 y 10 mg/ml de medios.

30 **Cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCII (pico 1 de IEX)**

Tamaño de columna:	880 ml en XK50/60 (54 cm de altura de lecho)
Amortiguador:	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, NaCl 150 mM, arginina 0,1 M, pH8.0
Muestra:	~44 ml (5 % CV) a 2,5 mg/ml (en 10 mM Tris, 3 mM CaCl ₂ , ~60 mM de NaCl, 0,1 M de arginina, pH 8,0)
Caudal:	8,8 ml/min

35 La Figura 41 ilustra un cromatograma después de la cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCII (Pico 1 de IEX). El pico se agrupó para dar ~ 60 ml de ABC II a 1,2 mg/ml.

La Figura 42 muestra un gel de SDS-PAGE de cromatografía de permeación en gel superdex 75 de ABC II concentrada ejecutado en presencia de arginina. El gel se tiñe con azul Coloidal.

Cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCI (pico 2 de IEX):

Tamaño de columna:	880 ml en XK50/60 (54 cm de altura de lecho)
Amortiguador:	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, NaCl 150 mM, arginina 0,1 M, pH8.0
Muestra:	~42 ml (5 % CV) a 2,0 mg/ml (en 10 mM Tris, 3 mM CaCl ₂ , ~60 mM de NaCl, 0,1 M de arginina, pH 8,0)
Caudal:	8,8 ml/min

5 La Figura 43 ilustra un cromatograma después de la cromatografía de permeación en gel Superdex 75 de ABCI (Pico 2 de IEX). El pico se agrupó para dar ~ 60 ml de ABC I a 1,1 mg/ml.

La Figura 44 muestra un gel de SDS-PAGE de cromatografía de permeación en gel superdex 75 de ABC I concentrada ejecutado en presencia de arginina. El gel se tinte con azul Coloidal.

10 **Aumento del tamaño de la columna**

Tabla 18

Escala del Proceso	Hidroxiapatita			Fractogel TMAE		
	Volumen de medios	Tipo de columna	Altura del lecho	Volumen de medios	Tipo de columna	Altura del lecho
1/3	220 ml	XK50/30	~11 cm	18 ml	XK16/20	~9 cm
5 l	2x 300mL	XK50/30	~15 cm	54 ml	XK26/40	~10 cm
20 l	2,4 l (a 1 mg/ml de carga)	*	*	216 ml	XK50/20	~11 cm
200 l	24 l	*	*	2,2 l	*	*
Escala del Proceso	Q Sepharose HP			Superdex 75		
	Volumen de medios	Tipo de columna	Altura del lecho	Volumen de medios	Tipo de columna	Altura del lecho
1/3	65 ml	XK26/20	~12 cm	300 ml	XK26/70	~57 cm
5 l	100 ml	XK50/20	~5 cm	880 ml	XK50/60	~45 cm
20 l	400 ml (a 3 mg/ml de carga)	*	*	4 l	*	*
200 l	4 l (a 3 mg/ml de carga)	*	*	40 l	*	*

* El tipo de columna y la altura de lecho resultante deben optimizarse aún más. Los volúmenes de medios son aumentos de escala lineales desde la escala de 5 l.

15 La Figura 44b ilustra un esquema de flujo del proceso de purificación de 5 l.

20 En otras realizaciones más de la invención, las etapas de diálisis del proceso de purificación descrito anteriormente pueden sustituirse con operaciones de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando diálisis y las células agitadas se reemplazarán por TFF, filtración de flujo tangencial. La etapa TMAE analizado anteriormente es opcional.

25 La invención incluye los productos de colagenasa que son producidos por (o pueden ser producidos por) los procesos de purificación anteriores. Dichos productos de colagenasa poseen un alto grado de pureza y una actividad enzimática retenida. Por ejemplo, las composiciones están libres de clostripaína (por ejemplo, poseen niveles despreciables o indetectables de clostripaína).

Optimización de los Procesos de Fabricación:

30 Para respaldar los estudios clínicos y proporcionar un proceso a escala comercial, se completó la optimización del proceso de fabricación desarrollado anteriormente. Los cambios del proceso se describen brevemente a continuación y se describen en la Tabla 19.

Tabla 19: Resumen de los cambios del proceso entre BTC (Proceso 1) y Auxilium Supplies (Procesos 2 y 3)

Etapa		Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3
Fermentación y Recuperación Primaria				
	Línea celular	013 y 004	004	004
	Forma de almacenamiento de línea celular	Liofilizado	Cultivo de líquido congelado	Cultivo de líquido congelado
	Medio de banco de células	De origen bovino	No derivado de animales	No derivado de animales
	Medio de siembra	De origen bovino	No derivado de animales	Peptona proteosa (derivada del cerdo)
	Estrategia de ampliación de la escala de semillas	1 vial de WCB → 1 x botella de 500 ml → fermentador de 45 l	2 viales WCB → 2x30 ml → 2 x matraces de 500 ml → 1 x fermentador de 20 l	1 vial WCB → 3x25 ml → 4 x frascos de 200 ml → 1 x fermentador de 20 l → fermentador de 200 l
	Medio de producción	De origen bovino	No derivado de animales	Peptona proteosa (derivada del cerdo)
	Esterilización del medio de producción	Esterilizado en autoclave	Sartoclear maxicap y filtros de 0,2 µm	Esterilización de medios <i>in situ</i> y filtración de 0,2 micrómetros
	Estrategia de producción	Discontinua	Discontinua alimentada	Discontinua
	Escala de Producción	45 l	20 l	200 l
	Método de cosecha	Tren de filtro de 10 µm y 1 µm	Millipore Millistak HC Pod	Filtro Millipore Millistak HC Pod
	Precipitación con sulfato de amonio (AS pp)	95% de saturación	60% de saturación	Captura de proteínas utilizando medios de cromatografía de baja sustitución Fenil
	Sepharose FF Intercambio de amortiguador de pp SA	Diálisis	Diálisis	N/A
	Control de temperatura	Ninguno	Soluciones 2-8 °C	Soluciones 2-8 °C
Purificación				
	Nueva etapa de cromatografía/filtración	NA	Mustang Q	Mustang Q
	Nueva etapa de cromatografía	NA	Superdex 75 GPC	Eliminación de hidroxapatita (HA) y GPC
	Sistemas de amortiguador de HA y Q HP	menos leupeptina	200 µM de leupeptina	200 µM de leupeptina
	Control de temperatura	Ninguno	Amortiguadores y empaquetamientos de columna de 2 a 8 °C	Amortiguadores y empaquetamientos de columna de 2 a 8 °C
	Intercambio de amortiguador Pre-Q HP	Diálisis	Diálisis	TFF
	Intercambio de amortiguador Post-Q HP	Diálisis	Diálisis	NA
	Concentrado/diafiltro en la formulación final	Diálisis	Diálisis	TFF

Etapa		Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3
Fermentación y Recuperación Primaria				
	Aumento de escala de todas las etapas para una fermentación de 200 l	NA	NA	4,5 veces
Formulación	Formulación de la Sustancia Farmacéutica (DS)	DS en API diluida con lactosa	DS en API diluida con lactosa	DS en Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH 8,0

Optimización de la Fermentación

5 Se llevó a cabo la eliminación de las materias primas de origen bovino del banco de células original y el proceso de fermentación. La cepa 004 de *Clostridium histolyticum* se propagó para su uso como banco de células maestras en función de la viabilidad de pasaje requerida para el aumento de escala. Las especificaciones y los resultados analíticos para el banco de células maestras se capturan en la Tabla 20. Para aumentar la biomasa y la producción de colagenasa, se desarrolló una estrategia de fermentación alimentada discontinua utilizando materias primas no de animales en el medio de crecimiento a una escala de fermentación de 20 litros. Se observó que una mayor
10 ampliación de la fermentación a 200 litros requería el uso de un componente de medio de origen porcino (es decir, proteosa peptona n.º 3, *infra*) para garantizar un crecimiento celular constante, la expresión de colagenasa y un perfil de impurezas mejorado. Se hicieron cambios posteriores para aumentar el rendimiento y la pureza de la colagenasa en el proceso posterior. Estos cambios incluyen la adición de nuevas estrategias de separación y filtración, así como la ampliación del equipo de producción para soportar la escala de fermentación discontinua de
15 200 litros. La Figura 45 muestra un diagrama de flujo de la fermentación para el proceso 3.

Tabla 20: Especificaciones analíticas y resultados de pruebas para el Banco de Células Maestras

Ensayo	Especificación	Resultado
Identidad	Perfil esperado, > 95 % ID	Perfil esperado, 99,9 % ID
Recuento viable	$\geq 1 \times 10^6$ ufc/ml en agar TB	$1,3 \times 10^7$ ufc/ml en agar TB
Prueba de pureza	No se observaron organismos extraños	No se observaron organismos extraños
Morfología de la colonia (anaeróbica a 37 °C)	Forma irregular, 1-2 mm de tamaño, color gris a blanco	Irregular, elevación plana, margen ondulado de 1-2 mm de diámetro (48 h), gris, color blanco
Tinción de Gram	Barras Gram positivas	Barras Gram positivas
Fermentación de Dextrosa con Fenol Rojo	Negativa	Negativa
Producción de Sulfuro de hidrógeno	Positiva	Positiva
Prueba de gelatinasa	Positiva	Positiva
Prueba de esporas	Negativa	Negativa en todos los medios
Crecimiento en medios de carne cocida	Positiva	Positiva
Crecimiento en medios de tioglicolato	Crecimiento como proyección en forma de dedo	Crecimiento como proyección en forma de dedo
Test de motilidad (medios MIO)	No-móvil	No-móvil
Bacteriófago	Ninguno detectado	No hay evidencia confirmada de fago

20 Optimización de la Recuperación y Purificación Primaria

Se está llevando a cabo un desarrollo adicional para optimizar la recuperación primaria y el proceso de purificación posterior. La sustitución de la precipitación con sulfato de amonio con cromatografía de sub-columna baja de caudal rápido de fenil sepharose para capturar las colagenasas se ha implementado para mejorar los rendimientos,
25 eliminar el uso de sulfato de amonio a granel y mejorar el procesamiento aséptico.

Con respecto a la purificación, el filtro Pall Mustang Q se ha implementado para la eliminación de impurezas y ADN residual para mejorar aún más los rendimientos y simplificar el tren del proceso de producción y los requisitos de validación. Los parámetros de funcionamiento de la Amina Cuaternaria Sepharose de Alto Rendimiento (Q HP) se han optimizado para eliminar la etapa de Cromatografía de Permeación en Gel (GPC). Además de los cambios en el proceso citados anteriormente, la formulación de la sustancia farmacéutica se ha modificado para incluir Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH 8.0, mejorando la solubilidad del producto y la estabilidad de la sustancia farmacéutica y del producto farmacéutico.

El proceso de optimización se llevó a cabo en dos etapas. El proceso inicial (Proceso 2) utiliza un medio libre de animales para todas las etapas de banco celular y fermentación, con la fermentación discontinua alimentada realizada en la escala de 20 litros. El proceso posterior se ha adaptado del Proceso 1 para incluir la filtración Mustang Q para la eliminación del ADN residual y Superdex 75 GPC para la eliminación adicional de contaminantes de la célula hospedadora. La leupeptina también se ha agregado a los sistemas de amortiguador de cromatografía para prevenir la degradación proteolítica. El material del proceso 2 se ha superado analíticamente con el material del proceso 1 (Tabla 21A) y se probó en un estudio pre clínico en paralelo indicado aquí. El material del proceso 2 se ha propuesto para su uso en la etapa inicial del programa clínico de la Fase 3. Las especificaciones para los intermedios del proceso 2 y la sustancia farmacéutica se detallan en las Tablas 22 y 23, respectivamente. El desarrollo adicional de procesos, formulación y liofilización proporcionó un proceso de fabricación optimizado (Proceso 3). Estos cambios incluyen la adición de nuevas estrategias de separación y filtración, así como la ampliación del equipo de producción para soportar la escala de fermentación discontinua de 200 litros como se indica en la Tabla 19. La Figura 46 muestra un diagrama de flujo de la purificación para el proceso 3.

Declaración de dosis: El ensayo de potencia *in vitro* inicial fue un ensayo de colagenasa bovina y no diferenció los tipos I y II de colagenasa. Este ensayo se utilizó para el material utilizado solamente en los estudios clínicos abiertos DUPY101 y DUPY 202, con la dosis de 0,58 mg que generalmente da como resultado una potencia de 10.000 unidades. El análisis del material del Proceso 1 que utiliza los ensayos de potencia *in vitro* separados actuales para la colagenasa tipo I y la colagenasa tipo II generalmente da como resultado 1.700 a 3.500 Unidades/dosis (dosis de 0,58 mg) para la colagenasa tipo I y de 43.000 a 69.000 Unidades/dosis (dosis de 0,58 mg) para la colagenasa tipo II. El análisis del material del Proceso 2 que utiliza los actuales ensayos de potencia *in vitro* ha confirmado que típicamente se alcanzan valores de potencia relativa similares en comparación con el material del Proceso 1.

Demostración de la comparabilidad analítica entre el Proceso 1 y el Proceso 2: Con el fin de soportar los cambios entre el Proceso 1 y el Proceso 2, los datos de comparabilidad se han presentado en forma de pruebas de liberación. Estos datos se presentan en la Tabla 21.

Comparación de los intermedios, descritos como AUX-I y AUX-II, y sustancia farmacéutica del proceso anterior (Proceso 1; Referencia) con un proceso de la invención (Proceso 2). Esta comparación analítica muestra que el material fabricado a partir del Proceso 2 es comparable al realizado con el Proceso 1 (Tabla 21). En particular, la identidad, potencia y pureza entre estos materiales son comparables.

El nivel de pureza de los productos intermedios del Proceso 2 se muestra en la Fig. 47, un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE reducido. El gel muestra una banda única para cada intermedio sin ninguna otra banda menor evidente. AUX-I tiene un MW aparente de 115 kDa y se compara con la referencia (ABC I), AUX-II tiene un MW aparente de 110 kDa y se compara con la referencia (ABC II). La Figura 48 muestra un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE reducido que representa la sustancia farmacéutica. Al igual que con los intermedios, la sustancia farmacéutica fabricada por el Proceso 2 se compara con la referencia (Proceso 1). En la Fig. 49 se muestra un gel de SDS-PAGE con tinción de plata que demuestra adicionalmente el alto nivel de pureza de la sustancia farmacéutica del Proceso 2. En resumen, las pruebas de liberación y la caracterización analítica de los intermedios (AUX-I y AUX-II) y la sustancia farmacéutica fabricada utilizando el Proceso 2 demuestran claramente la comparabilidad con los materiales del Proceso 1 (Referencia). Adicionalmente, se realizaron pruebas adicionales de liberación en el material del Proceso 2 y se enumeran en la Tabla 21B. En conclusión, la comparación analítica directa entre los materiales del Proceso 1 y del Proceso 2 (Tabla 21), y las pruebas adicionales de intermedio y liberación (Tabla 22) indican que el material del Proceso 2 es adecuado para su uso en estudios en humanos. Las tablas 23 y 24 enumeran adicionalmente las especificaciones analíticas resultantes del proceso de fabricación del Proceso 2.

Tabla 21: Comparabilidad analítica entre intermedios (Proceso 1) y Auxilium (Proceso 2) y sustancia farmacéutica.

Ensayo	AUX-I intermedio	AUX-II intermedio	Sustancia farmacéutica	Especificación de la sustancia farmacéutica	
Identidad por SDS-PAGE	Se ajusta a la referencia (véase adjunto)	Se ajusta a la referencia (véase adjunto)	Se ajusta a la referencia (véase adjunto)	Banda principal de colagenasa entre 100 - 115 kDa; no hay bandas secundarias	Banda principal de colagenasa entre 107 - 110 kDa; no hay bandas secundarias
Ensayo de colágeno del tendón de cola de rata	2310 unidades/mg	-	2866 unidades/mg	1700 - 3500 unidades/mg	
Potencia (AUX-I)					
Proceso 1 Referencia	2704 unidades/mg	-	2018 unidades/mg	*	
Potencia para las colagenasas de clase II (AUX-II)	-	179704 unidades/mg	50955 unidades/mg	43000 - 69000 unidades/mg	
Proceso 1 Referencia	-	174045 unidades/mg	58491 unidades/mg	*	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (pureza y agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	100 % del pico principal; 0% de agregados	100 % del pico principal; 0% de agregados	100 % del pico principal; 0% de agregados	≥ 99 % del pico principal; ≤ 1 % de agregados por área	
Proceso 1 Referencia	87 % del pico principal; 13% de agregados	90 % del pico principal; 10% de agregados	Se utiliza intermedio**	*	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad y pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	99 % AUX-II 1 % AUX-II	100% AUX-II	100% AUX-I y AUX-II	2 picos principales (AUX I y AUX II), combinados ≥ 97% por área; Tiempos de retención de AUX-I y AUX-II dentro del 5% de referencia	
Proceso 1 Referencia	89,4% ABC-I; 5,4% ABC-II; 5,2% otros	93% ABC-II; 0,5% ABC-I; 6,5% otros	Se utiliza intermedio**	*	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (Gelatinasa por cromatografía de intercambio)	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 % por área	
Proceso 1 Referencia	< 1 %	< 1 %	< 1 %	*	
Mapeo de péptidos por Digestión Triptica y HPLC de Fase Inversa	El patrón de pico se ajusta a la referencia	N/A	El patrón de pico se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia	

Ensayo	AUX-I intermedio	AUX-II intermedio	Sustancia farmacéutica	Especificación de la sustancia farmacéutica
Secuenciación de N-terminal y de C-terminal	Secuencia idéntica a la de Referencia***	Secuencia idéntica a la de Referencia	No es necesario	Se ajusta a la referencia
* Especificaciones preliminares del Proceso 1 no incluidas aquí				
** Sustancia farmacéutica no disponible para estas pruebas, suministros limitados a disponibilidad				
*** Secuenciación N-terminal completada para AUX-I (idéntica a la referencia), pero el desarrollo adicional requerido para AUX-II como extremo N parece estar bloqueado.				

Tabla 22: Resultados analíticos para intermedios del Proceso 2 y sustancia farmacéutica

Ensayo	AUX-I intermedio	AUX-II intermedio	Sustancia farmacéutica
pH de la solución	No es necesario	No es necesario	6,8
Concentración de Proteínas por Ensayo Bradford	No es necesario	1,54 mg/ml	No es necesario
Proteína total por espectrofotometría de absorbancia	1,36 mg/ml	1,39 mg/ml	1,41 mg/ml
Proteína de la hospedadora residual	No es necesario	No es necesario	Patrón de bandas similar a la Referencia
ADN de la hospedadora residual	No es necesario	No es necesario	2,9 ng/ml*
Endotoxina	No es necesario	No es necesario	8,7 UE/mg
Leupeptina Residual	No es necesario	No es necesario	< 1 µg/ml
* El resultado está en el LOQ del método de ADN residual anterior			

5 **Tabla 23: Especificaciones analíticas para los intermedios AUX-I y AUX-II del Proceso 2**

Ensayo	Especificación	
	AUX-I	AUX-II
Aspecto	Claro incoloro y libre de materia particulada	Claro incoloro y libre de materia particulada
*Endotoxina	< 10 UE/ml	< 10 UE/ml
Identidad (y pureza) por SDS-PAGE (condiciones reducidas, tinción con Coomassie y plata)	Banda principal entre 110 - 115 kDa, y sin bandas secundarias	Banda principal entre 107 - 110 kDa, y sin bandas secundarias
* Proteína total por espectroscopia de absorbancia	1,0 - 1,5 mg/ml	1,0 - 1,5 mg/ml
Ensayo SRC (AUX-I)	1900 - 3300 unidades/mg	No aplicable
Ensayo GPA (AUX-II)	No aplicable	4300 - 6400 unidades/mg
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	≥ 99 % del pico principal; ≤ 1 % de agregados por área	≥ 99 % del pico principal; ≤ 1 % de agregados por área
* Análisis de proteínas mediante el sistema HPLC Agilent 1100 (pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	≥ 97 % por área	≥ 97 % por área
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (Pureza por cromatografía de líquidos de fase inversa)	< 1 % por área	< 1 % por área
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (clostripaina residual por cromatografía de líquidos de fase inversa)	< 1 % por área	< 1 % por área
Identidad por Mapeo de Péptidos	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia

Ensayo	Especificación	
	AUX-I	AUX-II
Carga biológica	<100 UFC/ml	<100 UFC/ml
*Pruebas requeridas para la liberación provisional de productos intermedios para fabricación adicional		

Tabla 24: Especificaciones analíticas para el Fármaco del Proceso 2

Ensayo	Especificación	
	AUX-I	AUX-II
Aspecto	Claro incoloro y esencialmente libre de partículas	
Medida potenciométrica del pH de la Solución	6,0 a 7,0	
Endotoxina	< 10 UE/ml	
Identidad (y pureza) por SDS-PAGE (condiciones reducidas, tinción con Coomassie y plata)	Banda principal de colagenasa entre 100 - 115 kDa; no hay bandas secundarias	Banda principal de colagenasa entre 107 - 110 kDa; no hay bandas secundarias
* Proteína total por espectroscopia de absorbancia	1,1 - 1,5 mg/ml	
*Ensayo SRC (AUX- 1)	1700 - 3500 unidades/mg	NA
* Ensayo GPA (AUX-II)	NA	43000 - 69000 unidades/mg
Proteína de la célula hospedadora residual	< 10 ppm	
ADN de la célula hospedadora residual	< 10 pg/dosis	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	≥ 99 % del pico principal; ≤ 1 % de agregados por área	
* Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad y pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	2 picos principales (AUX I y AUX II), combinados ≥ 97% por área; Tiempos de retención de AUX-I y AUX-II dentro del 5% de AA4500 referencia	
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (clostripaína residual por cromatografía de líquidos de fase inversa)	< 1 % por área	
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (Pureza por cromatografía de líquidos de fase inversa)	< 1 % por área	
Leupeptina residual por cromatografía de fase inversa	< 1 % por área	
*Carga biológica	<1 UFC/ml	
*Pruebas requeridas para la liberación provisional de Sustancia Farmacéutica para fabricación adicional		

5 **EXPERIMENTAL DETALLADO DEL PROCESO 3:****FERMENTACION DE PROCESO 3:**

10 El proceso de fermentación utilizando Fitona peptona empleada durante el Proceso 2 había mostrado una variabilidad significativa durante ambos suministros para el desarrollo de DSP y la fabricación de GMP.

15 Durante el trabajo anterior, se ha demostrado que una Proteosa Peptona derivada de animales soporta muy bien el crecimiento de *C. histolyticum*. El cultivo de Proteosa Peptona de origen animal produjo significativamente menos clostripaína que la observada durante el Proceso 2 y expresó AUXI y AUXII en una relación de 1:1. Como resultado, una peptona derivada de animales aceptable para la regulación, Proteosa Peptona #3 de Becton Dickinson (PP3) se evaluó en fermentadores de 5 l. La comparación inicial con el proceso existente basado en Fitona (Proceso 2) mostró que el uso de PP3 a 50 g/l generó una alta concentración de biomasa con una tasa de crecimiento exponencial rápida. La fermentación dio como resultado un mayor rendimiento del producto de > 350 mg/l de colagenasa total en oposición a ~ 230 mg/l del Proceso 2 (mediante análisis de SDS-PAGE semicuantitativo). Las fermentaciones adicionales utilizando PP3 demostraron que se produjo significativamente menos clostripaína
20 utilizando el medio de fermentación derivado de animales. Las tres primeras fermentaciones (utilizando un lote de

PP3) demostraron perfiles de crecimiento muy consistentes. Cuando el producto se analizó mediante SDS-PAGE, se encontró que el rendimiento y la pureza de la colagenasa eran muy reproducibles entre las tres fermentaciones.

Para suministrar DSP con material para el desarrollo del proceso, se llevaron a cabo varias fermentaciones utilizando PP3. Para este material de suministro se utilizaron tres lotes diferentes de PP3. Se observó que cuando se utilizaron dos de estos lotes, los perfiles de crecimiento de los cultivos no eran consistentes con las fermentaciones con PP3 anteriores y demostraron una variabilidad en el perfil de crecimiento entre las fermentaciones. Una investigación a pequeña escala mostró que la variabilidad de lote a lote en la PP3 causó esta variación. El estudio a pequeña escala también demostró que un aumento en la concentración de PP3 a 100 g/l evitaría esta variación.

Se realizaron dos fermentaciones de 5 litros con 100 g/l de PP3 utilizando dos lotes de peptona, uno que dio como resultado el perfil de crecimiento típico y uno que no lo hizo (como se demostró durante el experimento a pequeña escala). El experimento mostró que el aumento en la concentración aseguró que las dos fermentaciones con diferentes lotes de PP3 fueran reproducibles. Los perfiles de crecimiento fueron muy similares y el producto se expresó con un rendimiento y pureza similares.

El proceso de fermentación optimizado que utiliza 100 g/l de PP3 fue finalmente ampliado a 200 l. El perfil de crecimiento de 200 l fue muy similar al observado en la escala de 5 l. El análisis de SDS-PAGE del filtrado de fermentación mostró un alto rendimiento de la fermentación de 200 l, ~ 320 mg/l de colagenasa total (mediante análisis de densitometría cuantitativa). La pureza del producto de colagenasa (post fermentación) fue similar a escala tanto de 5 l como de 200 l. El grupo DSP procesó 20 l del filtrado de fermentación de 200 l para representar una ampliación parcial del proceso posterior (citado a continuación).

El proceso de fermentación de Proteosa Peptona #3 (Proceso 3) generó colagenasa con un rendimiento más alto y con menos clostripaina que el proceso con Fitona existente. A 100 g/l se demostró que PP3 producía cultivos de *C. histolyticum* con curvas de crecimiento reproducibles a pesar de usar varios lotes de PP3. También se demostró que tanto el rendimiento como la pureza de la colagenasa son reproducibles cuando se usan varios lotes de PP3.

Evaluación de la Proteosa Peptona #3 como materia prima para la producción de colagenasa a partir de *Clostridium histolyticum*.

Debido a la variabilidad observada en las fermentaciones que utilizan la Fitona Peptona como una fuente de nitrógeno compleja, se evaluó la adecuación de la Proteosa Peptona #3 (Becton Dickinson, 212230) (PP3) en fermentaciones de 5 l. Se utilizó una estrategia discontinua simple con 50 g/l de PP3. La composición exacta del medio se puede encontrar en la sección de materiales y métodos.

La Figura 51 compara la curva de crecimiento de la fermentación de 50 g/l de PP3 (una concentración más baja que la concentración de Fitona en el Proceso 2) con la fermentación alimentada discontinua con Fitona. El cultivo con PP3 demuestra una tasa de crecimiento específico muy rápida durante el crecimiento exponencial antes de entrar en la fase estacionaria aproximadamente 8 horas después de la inoculación. La fermentación con PP3 alcanzó una densidad óptica máxima (600 nm) de 4,7 unidades. El cultivo se dejó durante 12 horas más en fase estacionaria para controlar la formación/degradación del producto.

La Figura 52 muestra el análisis de SDS-PAGE semicuantitativa de la concentración de los productos de colagenasa a partir del punto de 20 horas del cultivo con PP3. La Figura 53 muestra el mismo análisis para el proceso de alimentación discontinua con Fitona. Se puede observar que la fermentación con PP3 genera más producto que el proceso basado en Fitona (un aumento de 230 mg/l a 360 mg/l de colagenasa total, basado en el análisis semicuantitativo en las figuras 52 y 53). El cultivo con PP3 también expresó AUXI y AUXII en una relación de 1:1, mientras que el Proceso 2 produjo las dos proteínas en una relación de 1: 1,6.

Reproducibilidad de la fermentación discontinua de Proteosa Peptona #3.

La reproducibilidad del proceso discontinuo con PP3 se examinó adicionalmente utilizando el lote número 5354796 de Proteosa Peptona número 3. Las tres ejecuciones ilustradas en la figura 54 demuestran perfiles de crecimiento consistentes con una densidad óptica máxima (600 nm) de aproximadamente 4,5 obtenida después de 8 horas.

El análisis de SDS-PAGE semicuantitativa de los momentos de cosecha de la fermentación mostró que el rendimiento de colagenasa total fue de ~ 350 - 400 mg/l.

El momento de cosecha de la fermentación también se evaluó durante este estudio. Las fermentaciones se cosecharon a las 8, 11 y 20 horas. Las Figuras 55 y 56 muestran el análisis de SDS-PAGE del curso temporal de la fermentación con PP3 GCFT05d (cosechada a las 11 horas). El gel representado en la figura 55 se ha teñido con azul coloidal y el gel en la figura 56 se ha teñido con plata. Puede observarse una tercera banda de peso molecular más alto por encima de las dos bandas de colagenasa en los geles en las figuras 55 y 56. Se piensa que esta banda corresponde a una proteína precursora de AUXI indicada en la bibliografía. La banda precursora

está presente durante la fase de crecimiento exponencial. Al final del crecimiento exponencial, la banda precursora disminuye en intensidad y no está presente después de 11 horas (en GCFT05d). Los principales contaminantes de peso molecular más bajo se pueden ver en el gel con tinción de plata a aproximadamente 90, 60, 55, 45 y 40 kDa. Se debe tener en cuenta que estos contaminantes están presentes en un nivel bajo y solo se detectan claramente en el gel con tinción de plata. Se determinó que el momento de cosecha óptimo para la fermentación era ~ 11 horas en esta etapa de desarrollo. La Figura 57 muestra el análisis de SDS-PAGE de muestras del curso temporal de una fermentación alimentada discontinua con Fitona convencional. Se puede observar un contaminante de 40 kDa en el gel en la figura 57. Esta banda de contaminante de 40 kDa del proceso de alimentación discontinua de Fitona se identificó como la proteasa clostripaína. Al comparar los geles en las figuras 55 y 57, es posible determinar que la cantidad de clostripaína producida usando el proceso de fermentación con PP3 es significativamente menor que la fermentación basada en Fitona.

Generación de material de suministro para el desarrollo de procesos Posteriores

Para soportar el desarrollo del proceso posterior (DSP), se realizaron varias fermentaciones con 50 g/l de PP3. Durante estas fermentaciones se utilizaron dos lotes diferentes de PP3 (5332398 y 5325635). La Figura 58 muestra las curvas de crecimiento de estas fermentaciones (que se muestran en diamante) en comparación con una fermentación (que se muestra en un cuadrado) utilizando el lote número 5354796 (GCFT05d). Las fermentaciones con los nuevos lotes de PP3 muestran perfiles de crecimiento muy variados. Aunque las tasas de crecimiento inicial de los cultivos son todas muy similares, el punto en el que entran en la fase estacionaria y, por lo tanto, las concentraciones máximas de biomasa difieren considerablemente. Las densidades ópticas (600 nm) en los cultivos de inóculo mostraron muy poca variación (DO600 de la etapa de 5 ml; 2,9 - 3,6 unidades, DO600 de la etapa de 200 ml; 4,5 - 5,9 unidades) y ninguna reducción de los inóculos anteriores utilizando el lote PP3 # 5354796. La variación y la densidad óptica reducida (600 nm) solo se manifestaron en la etapa final (fermentación) del cultivo. Esto sugiere que la razón de la variación fue una limitación de nutrientes en el PP3 y que la cantidad del nutriente limitante varió entre lotes de PP3.

Aunque estas fermentaciones se utilizaron con éxito para el desarrollo de DSP y el análisis de SDS-PAGE mostró que no había una gran variación en la cantidad de colagenasa producida (350 - 400 mg/l de colagenasa total según el análisis de SDS-PAGE semicuantitativo, datos no mostrados), se decidió que todavía era fundamental investigar la razón de la variación. La variación en el perfil de crecimiento haría muy difícil predecir el momento de cosecha de la fermentación. También hubo inquietudes de que la limitación de nutrientes puede inducir la expresión de otras proteasas como se ve con el proceso de alimentación discontinua con Fitona y específicamente la proteasa, clostripaína.

Investigación sobre la variación entre los lotes de Proteasa Peptona #3.

El trabajo inicial con PP3 había demostrado un proceso altamente consistente con un mayor rendimiento de producto y niveles más bajos de la proteasa clostripaína. Cuando se emplearon nuevos lotes de PP3, se observó que la consistencia del proceso disminuyó significativamente con perfiles de crecimiento altamente variables. Se realizó un experimento en matraces de agitación para comparar directamente los tres lotes de PP3 utilizados hasta ahora (lotes 5354796, 5325635 y 5332398). El experimento replicó el proceso de inóculo en dos etapas del proceso de 5 l, pero reemplazó la fase de fermentación final con otro cultivo de 200 ml. Tener esta tercera etapa fue crítico, ya que la variación solo se observó en la etapa final de fermentación del proceso en experimentos previos. Las densidades ópticas (600 nm) de los cultivos se midieron en cada etapa de transferencia y los cultivos se utilizaron para inocular la siguiente etapa. El medio se preparó utilizando los tres lotes de PP3 a 50 g/l. Uno de los dos lotes que había dado como resultado concentraciones de biomasa más bajas de *C. histolyticum* durante los experimentos de 5 l (lote # 5332398) también se preparó a 100 g/l.

La Figura 59 muestra los resultados del experimento a pequeña escala. Se puede observar que los lotes 5325635 y 5332398 mostraron densidades ópticas reducidas (600 nm) en la tercera etapa de aproximadamente 2,5 unidades, que se consideraron lotes "malos" de PP3. El lote 5354796 mantiene una densidad óptica (600 nm) de 5 unidades en la tercera etapa de cultivo, este se consideró un lote "bueno" de PP3. Curiosamente, cuando la concentración de un lote "malo" de PP3 (5332398) se incrementó a 100 g/l, se logró la misma densidad óptica (600 nm) en la segunda y tercera etapa del cultivo. Estos datos soportan la teoría de que las desviaciones en los perfiles de crecimiento son causadas por la variación en la cantidad de un nutriente limitante entre lotes de PP3. No fue posible identificar este nutriente mediante pruebas analíticas de los lotes de PP3.

Evaluación de la Proteasa Peptona #3 a 100 g/l en fermentación de 5 l

Los resultados del estudio a pequeña escala demostraron que al aumentar la concentración de PP3 de 50 a 100 g/l se eliminaba el problema de la variabilidad de lote a lote. Este cambio de proceso se probó en una escala de 5 l usando un lote "bueno" y "malo" de PP3 (lote 5354796 y 5325635, respectivamente) según lo determinado durante la investigación a pequeña escala sobre la variabilidad de PP3. La Figura 60 muestra los perfiles de crecimiento de las dos fermentaciones. Los dos cultivos muestran tasas de crecimiento específicas idénticas durante la fase exponencial. La fermentación entra en la fase estacionaria y alcanza densidades ópticas máximas muy similares

(600 nm) de aproximadamente 6,5 unidades. Estos datos demuestran que el aumento de la concentración de PP3 alivia el problema de la variabilidad de lote a lote de PP3. Debido a la mayor concentración de biomasa lograda y la fase exponencial más larga en la fermentación, el momento de cosecha se extendió a 12 horas.

5 Las Figuras 61 y 62 muestran el análisis de SDS-PAGE de las dos fermentaciones utilizando 100 g/l de PP3. Los geles demuestran una expresión consistente de colagenasa en ambas fermentaciones. Las muestras de ambas fermentaciones parecen contener niveles similares de contaminante descrito en la figura 56, aunque parece que PBFT70d contiene un poco más de la banda de 40 kDa (clostripaína). Es posible que estas pequeñas diferencias se deban a las diferencias de tinción o carga. Nuevamente, la cantidad de clostripaína producida usando el proceso con PP3 es significativamente menor que el proceso con Fitona. La banda precursora parece persistir más tiempo en el curso temporal de la fermentación. Se recomendó que las futuras fermentaciones a 100 g/l se extendieran a una cosecha de 14 horas.

15 La presencia de la banda precursora destaca la importancia de la definición del momento de cosecha y su calificación durante la validación del proceso.

20 La Figura 63 muestra los datos del análisis de densitometría del gel en la figura 61. El gráfico compara la formación del producto y del precursor (área del pico de densitometría) con el crecimiento celular (DO600). La formación del producto parece ser consistente con el crecimiento celular y la tasa de producción disminuye a medida que el cultivo entra en la fase estacionaria. La banda precursora disminuye en intensidad a medida que termina el crecimiento exponencial, pero todavía está presente en el momento de cosecha de la fermentación.

Ampliación de 100 g/l de la fermentación con Proteosa Peptona #3 hasta 200 l.

25 Tras el aumento de la concentración de PP3 a 100 g/l, el proceso se escaló a 200 l. Para generar la cantidad requerida de inóculo para el recipiente de 200 l, se introdujo una tercera etapa de inóculo utilizando un fermentador de volumen de trabajo de 15 l. Se utilizaron 3 x cultivos de 200 ml para inocular el fermentador de 15 l y después de 12 horas de crecimiento, se inocularon 8 l de los 15 l en el recipiente de 200 l. La Figura 64 compara la curva de crecimiento de la fermentación de 200 l con las dos de 5 l utilizando 100 g/l de PP3. Según lo recomendado, el perfil de crecimiento se extendió a 14 horas para garantizar que la banda precursora hubiera desaparecido completamente antes de que comenzara el procesamiento. El perfil de crecimiento de la fermentación de 200 l es muy similar a la fermentación a escala de 5 l, lo que demuestra una ampliación exitosa del cultivo.

35 La Figura 65 muestra el análisis de SDS-PAGE del curso temporal de la fermentación de 200 l. El gel muestra la formación del producto durante el curso de la fermentación. El material en el momento de cosecha de 14 horas no contiene ningún precursor detectable y contiene niveles muy bajos de contaminantes. El producto generado a partir de la fermentación de 200 l parece muy similar al producido a partir del proceso de 5 l, lo que indica que el aumento en el número de generación del proceso de 200 l no ha tenido un efecto perjudicial. La Figura 66 muestra los datos del análisis de densitometría del gel en la figura 64. El gráfico compara la formación del producto y del precursor (área del pico de densitometría) con el crecimiento celular (DO600). La formación del producto parece ser consistente con el crecimiento celular y la tasa de producción disminuye a medida que el cultivo entra en la fase estacionaria. La banda precursora disminuye en intensidad a medida que termina el crecimiento exponencial. La banda precursora disminuye en intensidad más rápidamente en la fermentación de 200 l que en el cultivo de 5 l, PBFT70c (figura 63). La Figura 67 muestra el análisis de SDS-PAGE utilizando un gel Bis-Tris AL 4-12% en el curso temporal de la fermentación de 200 l. Los pesos moleculares aproximados de los contaminantes detectados se anotan en el gel.

50 El proceso de cosecha (aclarado por filtración) desarrollado para el Proceso 2 se evaluó durante la fermentación aumentada a 200 l. El cultivo celular se aclaró con éxito utilizando el proceso existente sin bloqueo del tren de filtro. El proceso de cosecha se describe en la sección de materiales y métodos. Se procesaron 20 l de filtrado de la fermentación de 200 l mediante DSP para demostrar una ampliación parcial del proceso 3 aguas abajo (*infra*).

Cuantificación del rendimiento del producto mediante análisis de densitometría

55 Se requirió un método más preciso y cuantificable para determinar la concentración del producto durante la etapa del proceso anterior que el análisis de SDS-PAGE semicuantitativa (figuras 62 y 63). El filtrado de fermentación tiene una gran cantidad de pigmento y péptidos del medio de crecimiento que hace que las técnicas de cuantificación de proteínas convencionales, como la UV y el ensayo Bradford, sean inutilizables. El análisis semicuantitativo realizado previamente se modificó y actualizó mediante el análisis de densitometría de los geles teñidos con Coomassie. El método involucró la carga de un intervalo de cantidades (0,2 - 1,2 µg/carril) de material de referencia mezclado AUXI y AUXII y diluciones de la muestra a cuantificar en un gel de Tris Glicina. A continuación se analizó la imagen escaneada y se estimó el área del pico para los patrones y las muestras. A continuación se construyó una curva patrón (colagenasa total) y se usó para cuantificar la cantidad de colagenasa total en las diluciones de la muestra. La Figura 68 muestra un ejemplo de una curva patrón de colagenasa y resalta la linealidad del método de cuantificación dentro del intervalo anticipado de las muestras. Los geles de Tris Glicina

no resolvieron completamente AUXI y AUXII, por lo que se cuantificó la colagenasa total en lugar de intentar cuantificar por separado las dos proteínas.

5 La cantidad de colagenasa se analizó para PBFT70c, PBFT70d y para las fermentaciones a escala de 200 l. Se encontró que la cantidad de colagenasa total era -280 - 350 mg/l para las tres fermentaciones.

Materiales y métodos

Preparación de los medios:

10

Preparación de los medios de 1 l

15

Se sometieron a autoclave los fosfatos para la preparación del inóculo (tabla 25) en una botella de 1 l a 121 °C durante 20 minutos. El medio a granel (tabla 26) se calentó inicialmente en un microondas a 60 °C para disolver completamente los componentes antes de autoclavar en una botella de 1 l a 121 °C durante 20 minutos. El PSA 1 (tabla 27) se filtró a través de un filtro Sartopore 2 de 150 cm² de 0,2 µm en una botella estéril de 250 ml. Los 300 ml de fosfatos autoclavados, 600 ml de medios a granel autoclavados y 100 ml de PSA 1 filtrado estéril se agruparon antes de preparar en alícuota en 30 ml de universales irradiados con rayos gamma (8x5 ml) y 500 ml en matraces Erlenmeyer (4x200 ml).

20

Tabla 25: Composición de fosfatos para la preparación de inóculo

Componente	Cantidad Requerida
KH ₂ PO ₄	1,92 g
K ₂ HPO ₄	1,25 g
Na ₂ HPO ₄	3,5 g
NaCl	2,5 g
Agua desionizada	Hasta 300 ml

25

Tabla 26: Composición del medio a granel para la preparación de inóculo

Componente	Cantidad Requerida
Proteosa peptona nº 3	50 g o 100 g*
Extracto de levadura	8,5 g
Agua desionizada	Hasta 600 ml

*La receta del medio incluye PP3 a 50 y 100 g/l.

30

Tabla 27: Composición de PSA 1 magnesio/glucosa para la preparación de inóculo

Componente	Cantidad Requerida
MgSO ₄ ·x7H ₂ O	0,08
Glucosa	5 g
Solución de vitaminas	10 ml
Agua desionizada	Hasta 100 ml

Tabla 28: Solución de vitaminas para la preparación de inóculo

Componente	Cantidad Requerida
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 g
Riboflavina	50 mg
Niacina	100 mg
Pantotenato de calcio	100 mg
Ácido pimérico	100 mg
Piridoxina	100 mg
Tiamina	100 mg
Agua desionizada	Hasta 1 litro

35

Preparación de los medios de 5 l

Se sometió a autoclave la solución de fosfato para la escala de 5 l (tabla 29) en una botella de 1 l a 121 °C durante 20 minutos. El medio a granel (tabla 30) se añadió directamente al recipiente de 5 l y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos. El PSA 1 (tabla 31) se filtró a través de un filtro Sartopore 2 de 150 cm² de 0,2 µm en una botella estéril

ES 2 992 881 T3

de 500 ml. La solución de 250 ml de fosfato y 200 ml de PSA 1 se bombearon por separado en el recipiente de 5 l al completar el autoclave y enfriar el recipiente.

Tabla 29: Composición de Fosfatos para la fermentación de 5 l

5

Componente	Cantidad Requerida
KH ₂ PO ₄	9,22 g
K ₂ HPO ₄	6 g
Na ₂ HPO ₄	16,8 g
NaCl	12 g
Agua desionizada	Hasta 250 ml/278,35 g

Tabla 30: Composición del medio a granel para la fermentación de 5 l

Componente	Cantidad Requerida
Proteosa peptona nº 3	240 g o 480 g*
Extracto de Levadura de Bacto	40,8 g
Agua desionizada	Hasta 4,35 l

10 *La receta del medio incluye PP3 a 50 y 100 g/l.

Tabla 31: Composición de PSA 1 magnesio/glucosa para la fermentación de 5 l

Componente	Cantidad Requerida
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,38 g
Glucosa	24 g
Solución de vitaminas	48 ml
Agua desionizada	Hasta 200 ml/200 g

15 Tabla 32: Solución de vitaminas para la fermentación de 5 l

Componente	Cantidad Requerida
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 g
Riboflavina	50 mg
Niacina	100 mg
Pantotenato de calcio	100 mg
Ácido pimérico	100 mg
Piridoxina	100 mg
Tiamina	100 mg
Agua desionizada	Hasta 1 litro

Preparación de los medios de 15 l

20 La solución de fosfato (tabla 33) se filtró a través de un filtro Sartopore 2 de 300 cm² de 0,2 µm en una botella estéril de 2 l. El medio a granel (tabla 34) se agregó directamente al recipiente de 20 l antes de la esterilización con vapor en el sitio (SIP) del recipiente. El PSA 1 (tabla 35) se filtró a través de un filtro Sartopore 2 300 cm² de 0,2 µm en una botella estéril de 1 l. Los 750 ml de fosfatos y 600 ml de PSA 1 se bombearon por separado en el recipiente de 20 litros al completar la SIP y enfriar el recipiente.

25

Tabla 33: Composición de Fosfatos para la fermentación de 15 l

Componente	Cantidad Requerida
KH ₂ PO ₄	27,66 g
K ₂ HPO ₄	18 g
Na ₂ HPO ₄	50,4 g
NaCl	36 g
Agua desionizada	Hasta 750 ml/835,05 g

Tabla 34: Composición del medio a granel para la fermentación de 15 l

30

Componente	Cantidad Requerida
Proteosa peptona nº 3	1,44 kg
Extracto de Levadura de Bacto	122,4 g
Agua desionizada	Hasta 13,05 l

ES 2 992 881 T3

Tabla 35: Composición de PSA 1 Magnesio/Glucosa para la fermentación de 15 l

Componente	Cantidad Requerida
MgSO ₄ ·x7H ₂ O	1,14 g
Glucosa	72 g
Solución de vitaminas	144 ml
Agua desionizada	Hasta 600 ml/600 g

5 Tabla 36: Solución de vitaminas para la fermentación de 15 l

Componente	Cantidad Requerida
FeSO ₄ x 7H ₂ O	1,2 g
Riboflavina	50 mg
Niacina	100 mg
Pantotenato de calcio	100 mg
Ácido pimélico	100 mg
Piridoxina	100 mg
Tiamina	100 mg
Agua desionizada	Hasta 1 litro

Preparación de los medios de 200 l

10 La solución de fosfato (tabla 37) se filtró a través de un filtro Sartopore 2 de 300 cm² de 0,2 µm en una bolsa de 10 l Gammasart Biosystem SA10. El medio a granel (tabla 38) se agregó directamente al recipiente de 200 l antes de la esterilización SIP del recipiente. La solución de PSA 1 (tabla 39) se filtró a través de un filtro de 300 cm² de 0,2 µm en una bolsa de 10 l Gammasart Biosystem SA10. Los 10 l de fosfatos y 8 l de PSA 1 se bombearon por separado en el recipiente de 200 litros al completar la SIP y enfriar el recipiente.

15 Tabla 37: Composición de Fosfatos para la fermentación de 200 l

Componente	4 x Fermentadores
KH ₂ PO ₄	368,8 g
K ₂ HPO ₄	240 g
Na ₂ HPO ₄	672 g
NaCl	480 g
Agua desionizada	Hasta 10 l/11,134 kg

20 Tabla 38: Composición del medio a granel para la fermentación de 200 l

Componente	Cantidad Requerida
Proteosa peptona nº 3	19,2 kg
Extracto de Levadura de Bacto	1.632 kg
Agua desionizada	Hasta 174 l

Tabla 39: Composición de PSA 1 Magnesio/Glucosa para la fermentación de 200 l

Componente	Cantidad Requerida
MgSO ₄ ·x7H ₂ O	15,2 g
Glucosa	960 g
Solución de vitaminas	1,92 l
Agua desionizada	Hasta 8 l/8 kg

25 Tabla 40: Solución de vitaminas para la fermentación de 200 l

Componente	Cantidad Requerida
FeSO ₄ x 7H ₂ O	2,4 g
Riboflavina	100 mg
Niacina	200 mg
Pantotenato de calcio	200 mg
Ácido pimélico	200 mg
Piridoxina	200 mg
Tiamina	200 mg
Agua desionizada	Hasta 2 l/2 kg

Fermentación

5 La Figura 69 ilustra descripciones generales de los flujos de proceso para los procesos de fermentación con Fitona y PP3 a escala 5 y 200 l.

Fermentación a escala 5 l

10 Se descongeló un vial de WCB (2005 número 1019D) y se usaron partes alícuotas de 50 µl para inocular 8x5 ml de medio de inóculo en universales irradiados con rayos gamma de 30 ml. Los cultivos de 5 ml se incubaron a 37 °C en una jarra anaeróbica en presencia de 3 paquetes de gas anaeróbico. Después de aproximadamente 12 horas de incubación (DO600 3,0-4,0), se seleccionaron 2 cultivos de 5 ml y se usaron para inocular 2x200 ml de medio de inóculo en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Los dos matraces se colocaron juntos en una jarra anaeróbica con paquetes de 3 gases y se incubaron a 37 °C en una incubadora de agitación (70 rpm) durante 12 horas.

15 Después de 12 horas de incubación (DO600 6,0-7,0) se utilizó cada inóculo de 200 ml para inocular un recipiente de 5 l.

El volumen de trabajo de los vasos 5/7 L FT Applikon fue de 5 l, de los cuales el 4% (v/v) fue inóculo de la etapa de 200 ml. La velocidad de agitación se fijó a 100 rpm. El pH, dO₂ y la temperatura se controlaron a 7.00 unidades, 0% de saturación y 37°C respectivamente. El pH se controló con adiciones de HCl (5M) o NaOH (5M). La concentración de dO₂ se mantuvo al 0% mediante una continua inyección de nitrógeno, con un caudal de 1 l/min. Se tomaron muestras durante la fermentación y se filtraron a través de filtros de 0,2 µm antes de almacenarlos a -20 °C con fines analíticos. Las fermentaciones comenzaron a entrar en la fase estacionaria a una DO600 de 6,0-7,0. Después de 12 horas, el fermentador se enfrió a 10-20 °C antes de comenzar la recuperación de la cosecha.

25

Fermentación a escala 200 l

Se descongeló un vial de WCB (2005 número 1019D) y se usaron partes alícuotas de 50 µl para inocular 8x 5ml de medio de inóculo en universales irradiados con rayos gamma de 30 ml. Los cultivos de 5 ml se incubaron a 37 °C en una jarra anaeróbica en presencia de 3 paquetes de gas anaeróbico. Después de aproximadamente 12 horas de incubación (DO600 3.0-4.0), se seleccionaron 4 cultivos de 5 ml y se utilizaron para inocular 4 medios de inóculo de 200 ml de medio de inóculo en matraces Erlenmeyer de 500 ml. Dos matraces se colocaron juntos en jarras de gas anaeróbicas con paquetes de 3 gases y se dejaron incubar a 37 °C en un incubador de agitación (70 rpm) durante 12 horas. Después de 12 horas de incubación (DO600 6.0-7.0), se juntaron tres de los cuatro matraces y se usaron para inocular el recipiente de 20 l.

35

El volumen de trabajo de los recipientes de 20 l fue de 15 l, de los cuales el 4% (v/v) fue inóculo de la etapa de 200 ml. La velocidad de agitación se fijó a 100 rpm. El pH, dO₂ y la temperatura se controlaron a 7.00 unidades, 0 % y 37°C respectivamente. El pH se controló con adiciones de HCl (5M) o NaOH (5M). La concentración de dO₂ se mantuvo al 0% mediante una continua inyección en el espacio de cabeza de nitrógeno, con un caudal de 20 l/min.

40

Después de 12 horas de crecimiento en el recipiente de 20 l (DO600 6,0-7,0), se usaron 8 l de cultivo para inocular el recipiente de 200 l. Las condiciones de ejecución fueron idénticas a las de la escala de 20 l. La densidad óptica final (600 nm) en la cosecha fue de 6,0-7,0. Después de 14 horas, el fermentador se enfrió a 10-20 °C antes de comenzar la recuperación de la cosecha.

45

Cosecha**Cosecha de 5 l**

50

Los cultivos de 5 l se bombearon con un caudal de 5 l/h a través de un filtro de profundidad Millistak+ 10" Opticap (Millipore, KC0HC10FF1) y un filtro Sartopore 2 de 300 cm² de 0,2 µm en recipientes estériles de 250 ml. El material procesado se almacenó a -20 °C o se almacenó a 4 °C durante la noche antes del procesamiento por DSP.

Cosecha de 200 l

55

La cosecha de 200 litros se realizó utilizando un tren de cosecha por filtración. El cultivo se bombeó con un caudal de 200 l/h a través de un filtro de profundidad desechable Milistak + (MC0HC10FS1) con un área de filtración de 4x1m² seguido por dos filtros Express Opticap XL 10 de 0.2 µm, 2x0,49m² (Millipore, KHGES10TT1). El tiempo de proceso para el aclarado primario fue de 1 hora. Se permitieron 10 minutos adicionales al final de la cosecha para recuperar el producto residual retenido en los filtros. El sobrenadante aclarado se recogió en un banco de Palletank de Stedim de 200 l con el peso del filtrado registrado. Se pasaron 20 l de filtrado a través de una columna de ADN de alta afinidad Mustang Q con un caudal de ~ 6 l/min y se recogieron en dos bolsas stedim estériles de 20 l, antes del almacenamiento a 4 °C durante la noche.

60

65

Análisis

Medidas de la densidad óptica

5 El espectrofotómetro se puso en blanco usando PBS a una longitud de onda de 600 nm. Las muestras de fermentación se diluyeron con factores de 10, 20 o 100 (dependiendo de la densidad celular) utilizando PBS.

Se transfirió 1 ml de cada muestra diluida a una cubeta de 1 ml; la parte superior se selló e invirtió 5 veces antes de registrar lecturas de densidad óptica por triplicado a una longitud de onda de

10 600 nm.

Geles de Tris-Glicina

15 Las muestras de fermentación se filtraron a través de filtros de 0,2 µm antes de prepararlas para el análisis de SDS-PAGE. Se añadieron 10 µl de muestra filtrada a 10 µl de amortiguador de muestra (2x), 2,5 µl de agente reductor (10x) y 2 µl de EDTA 0,1M (para lograr una concentración final de 10 mM). El marcador de alto peso molecular (HMW) se preparó agregando 10 µl de solución madre concentrada a 80 µl de agente reductor (10x), 310 µl de API y 400 µl de amortiguador de muestra (2x). El HMW diluido convencional se calentó a continuación a 95 °C durante 5 minutos antes de hacer alícuotas y el almacenamiento a -20 °C para su uso en geles posteriores.

20 Se analizaron 15 µl de muestra de fermentación y 10 µl de marcador HMW en un gel de Tris-glicina al 8 % utilizando un tampón de procesamiento de Tris-glicina preenfriado (4 °C) a 130 V, 400 mA y 100 W durante ~1 hora y 50 minutos. Tras la electroforesis, los geles se sumergieron en 100 ml de reactivo de tinción azul coloidal (55 ml de API, 20 ml de metanol, 5 ml de tinte A, 20 ml de tinte B) y se dejó teñir durante 5 h en un agitador orbital a 60 rpm. Los geles se decoloraron con 200 ml de API. El gel se dejó en API durante 15-20 h hasta que se eliminó el exceso de tintura, después de lo cual el gel se escaneó y se secó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25

Geles de Bis-Tris

30 Las muestras de fermentación se prepararon para el análisis de SDS-PAGE mediante la adición de 10 µl de muestra filtrada de 0,2 µm a 4 µl de amortiguador de muestra (4x), 1,5 µl de agente reductor (10x) y 1,7 µl de EDTA 0,1M (para lograr una concentración final de 10 mM). Se analizaron 15 µl de muestra de fermentación y 10 µl de marcador Mark 12 en un gel Bis-Tris al 4-12 % y se analizaron utilizando un tampón de ejecución MES a 200 V, 400 mA y 100 W durante ~40 minutos. Tras la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de fijación de 100 ml (40 ml de dH₂O, 50 ml de metanol, 10 ml de ácido acético) durante 10 minutos antes de reemplazar con una solución de tinción de 95 ml (55 ml de dH₂O, 20 ml de metanol, 20 ml de tinte A) durante otros 10 minutos. Se añadieron 5 ml del tinte B a la solución de tinción y se dejó que los geles se tiñeran durante 5 h en un agitador orbital a 60 rpm antes de teñir con 200 ml de API. El gel se dejó en API durante 15-20 h hasta que se eliminó el exceso de tintura, después de lo cual el gel se escaneó y se secó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35

40 PURIFICACIÓN DEL PROCESO 3:

La primera escala de 20 l se ejecutó a través de un proceso recientemente desarrollado (Proceso 3) para la purificación de colagenasas de *Clostridium histolyticum*, el cual se modificó del Proceso 2 realizado a GMP a escala 20 l. Se introdujeron cambios significativos de proceso en el desarrollo del Proceso 3 para hacer que la purificación sea más consistente y más modificable para su ampliación y posterior validación del proceso. Un factor importante para facilitar este cambio de proceso fue la elección del componente de fermentación. El proceso 2 se había basado en el requisito de mantener un medio de fermentación a base de fitona, mientras que para el proceso 3 se usó proteosa peptona No. 3. El proceso de ejecución se divide en las etapas clave de la purificación posterior y las colagenasas AUXI y AUXII. Estos incluyen el tratamiento del filtrado de fermentación utilizando una cápsula Mustang Q, cromatografía de interacción hidrofóbica, etapa 1 de filtración de flujo tangencial (denotada TFF1), cromatografía de intercambio aniónico y etapa 2 de filtración de flujo tangencial (denotada TFF2). AUXI y AUXII se purifican conjuntamente en las etapas iniciales de la purificación y solo se separan durante la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (se realiza con medios Q-Sepharose HP). AUXI y AUXII se procesan por separado y se formulan. A continuación, los compuestos intermedios se mezclan en una relación 1:1 (según el contenido de proteína determinado por UV) y se filtran para formar la sustancia farmacéutica. En el proceso de desarrollo 3, se eliminaron las etapas clave asociadas con el proceso 2. Cabe destacar la etapa de precipitación con sulfato de amonio, se eliminaron dos etapas de cromatografía (cromatografía de permeabilidad con gel e hidroxipatita) y todas las etapas de retención a -20°C. El uso de etapas no escalables, tal como las células agitadas y la diálisis, también se eliminaron y se reemplazaron por filtración de flujo tangencial (TFF). El problema de la inestabilidad del producto, que fue evidente en el proceso 2 (y eliminó el uso de TFF), no fue aparente en la escala de 20 l del proceso 3. Sin embargo, el perfil de contaminantes asociado con el proceso 3 fue diferente al proceso 2 en el que clostripaína y gelatinasa habían sido componentes principales. Más en particular, se detectaron contaminantes de 40 kDa, 55 kDa y dos de 90 kDa (uno copurificante con AUXI y el otro con AUXII) mediante SDS-PAGE. Como resultado de estos nuevos contaminantes, algunos de los ensayos de control de calidad (como RPHPLC y SEC-HPLC) fueron de uso limitado ya que no resolvieron todas las impurezas del proceso 3. La incapacidad de utilizar los ensayos de control de calidad establecidos para la determinación de la pureza en el

45

50

55

60

65

proceso, dio lugar a la necesidad de definir un método para establecer qué material de la columna de QSepharose era adecuado para una purificación adicional. Esto fue necesario ya que los contaminantes no se resolvieron claramente a partir de los productos AUXI y AUXII en la columna QSepharose y, por lo tanto, fue necesario recolectar el material eluido en fracciones discretas, que podrían analizarse retrospectivamente. El análisis se realizó mediante SDS PAGE y la decisión de agrupamiento para la ejecución a través de 20 l se basó en la experiencia de la intensidad de tinción relativa de la impureza al producto utilizando una carga patrón de 1 µg.

El análisis de densitometría retrospectivo de SDS-PAGE permitió que los criterios de agrupación se describieran en función del porcentaje relativo de pureza del producto. Un análisis de densitometría adicional con material de la ejecución de demostración de 200 L permitió establecer un método estandarizado, así como una aproximación de la variación del ensayo. Esto llevó a un procedimiento acordado para la agrupación de las fracciones en proceso que se implementarán en la primera campaña de GMP.

Además de la descripción del proceso, se presenta un trabajo preliminar que describe un estudio de estabilidad del amortiguador y estabilidad de la muestra en proceso junto con la caracterización inicial de algunas de las impurezas asociadas con el Proceso 3.

El proceso 3 difería del proceso 2 en tres áreas principales. En primer lugar, se eliminaron la etapa de precipitación con sulfato de amonio y las etapas de cromatografía con hidroxipatita; en segundo lugar, se eliminó la etapa de cromatografía de permeación en gel (GPC) y, en tercer lugar, todas las etapas de intercambio de amortiguador se llevaron a cabo mediante filtración de flujo tangencial. La etapa de precipitación se reemplazó por el uso de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) por recomendación del cliente. El desarrollo de esta etapa dio como resultado la implementación exitosa de HIC para (i) la captura del producto (por lo tanto, sirvió como una etapa de concentración) y (ii) la eliminación de algunos contaminantes de proteínas y pigmentos. Posteriormente, también se demostró que la etapa de HIC reduce los niveles de ADNdc. Como resultado del programa de desarrollo de procesos, la introducción de HIC y la inclusión de una etapa Mustang Q eliminaron la necesidad tanto de la etapa de precipitación con sulfato de amonio como de la etapa de cromatografía con hidroxipatita. El efecto general fue simplificar la captura frontal del producto y eliminar una etapa de espera potencial asociada con el Proceso 2. Este último punto tuvo importancia porque previamente la evaluación de la fermentación podía realizarse antes de la purificación posterior, ya que los sedimentos resultantes de la etapa de precipitación podían mantenerse a -20 °C antes del procesamiento.

Después de la etapa de HIC, se intercambió el amortiguador del producto utilizando filtración de flujo tangencial (TFF). Esto se realizó utilizando membranas de límite de peso molecular de 30 kDa (MWCO) y se reemplazó el procedimiento de diálisis utilizado para el Proceso 2. La contaminación del agregado, que cuando estaba presente se detectó como derivado de AUXII, pareció eliminarse durante la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (IEX). Como resultado, se eliminó la etapa de GPC ya que tanto los intermedios AUXI como AUXII estaban dentro de las especificaciones para los agregados después de IEX. Por último, la concentración final y la formulación de los intermedios AUXI y AUXII se realizaron utilizando TFF en lugar del método anterior de utilización de células agitadas.

En general, el Proceso 3 representó un proceso más simple que fue más fácil de ampliar y validar que el Proceso 2. Además, la reducción en el costo de los consumibles fue evidente al eliminar la necesidad de medios de permeación de hidroxipatita y gel y por la cantidad reducida de etapas que requiere leupeptina. En la figura 46 se ofrece una descripción general del esquema de purificación para el Proceso 3.

Demostración no GMP ejecutada en escala de 20 l

El proceso 3 se realizó a una escala de 20 l en los laboratorios de desarrollo de procesos para demostrar si se podría generar material de calidad adecuada utilizando este proceso modificado a escala de 20 l. Un requisito clave para el procesamiento fue la capacidad de limitar la actividad potencial de la proteasa realizando etapas refrigeradas siempre que fuera posible y mediante la inclusión del inhibidor de la cisteína proteasa leupeptina en etapas clave del procedimiento. Se procesaron 20 l completos de filtrado de fermentación, ya que la materia prima se generó a partir de 200 litros de PP3 de fermentación. Los detalles de la fermentación y la posterior cosecha y filtración se documentan en un informe separado.

Tratamiento Mustang Q del filtrado de fermentación

Después de una filtración de 0,2 µm, se cargaron aproximadamente 22 litros de sobrenadante de fermentación en una cápsula de cromatografía Mustang Q como se describe anteriormente. Algo de contaminación de pigmento visible (verde/marrón) pareció eliminarse por la cápsula del Mustang Q durante la filtración de los primeros 10 l, ya que el contenido de la primera bolsa de Stedim de 10 l parecía visiblemente menos pigmentado que el segundo. La capacidad de la cápsula Mustang Q para eliminar el ADNdc se monitorizó a través de esta etapa mediante un análisis de pico verde de muestras pre y post Mustang Q (Tabla 41). En el proceso, el análisis indicó que, a diferencia de los datos anteriores generados a pequeña escala, la eliminación a granel de ácidos nucleicos no era

evidente en la etapa de Mustang Q. Por lo tanto, la consistencia y la aplicación de esta etapa requieren más investigación.

Tabla 41

5

Descripción de la muestra	Resultado ng/ml
Filtrado de fermentación	230,65
Post Mustang Q	216,53
Post HIC	1,02
Post TFF	6,34
Post IEX AUX I	2,33
Post IEX AUX II	3,41

Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

10 El uso de HIC cumplió tres funciones en la purificación. En primer lugar, el producto se redujo en volumen ya que se identificaron las condiciones en las que las colagenasas se unían a la resina. En segundo lugar, se eliminó algo de contaminante de pigmento y proteína en esta etapa y, en tercer lugar, el análisis de pico verde de esta ejecución indicó una reducción de ADNdc. La etapa HIC se realizó utilizando el sobrenadante procesado directamente de la fermentación (después del tratamiento con Mustang Q) y, como resultado una etapa de espera, (evidente en el Proceso 2 como el sedimento de sulfato de amonio) ya no estaba presente para el Proceso 3.

15

Para proporcionar las condiciones para que las colagenasas se unan a la columna HIC, el producto (20 l) del paso Mustang Q se diluyó con una solución de sulfato de amonio 3 M hasta una concentración final de 1 M. Después de la filtración, el producto se cargó en la columna y se eluyó utilizando una elución isocrática de 2 pasos.

20 La concentración de proteínas del material de carga HIC fue difícil de determinar con precisión y se estimó de dos maneras. En primer lugar, se realizó un ensayo Bradford sobre el material antes de la adición de sulfato de amonio. Esto se realizó con material sin diluir para estandarizar la contribución del pigmento presente en el medio de fermentación, que se sabía que interfería con el ensayo. En segundo lugar, la estimación se basó en el volumen de medio de fermentación cargado por ml de resina de columna. La carga de la columna se estimó en 5,9 mg de proteína total/ml de resina mediante el ensayo Bradford o, alternativamente, ~ 13 ml de medios de fermentación por ml de resina. Se determinó una estimación de la cantidad total de proteína diana eluida de la columna en 3,4 g usando UV (véase la Tabla 42). Suponiendo que la proteína total presente en la carga de HIC era de 9 g (ensayo Bradford), esto equivalía a una recuperación del 38%. Este valor solo se consideró como una medida relativa, sin embargo, debido a la inexactitud del ensayo para las muestras que contienen componentes de medios de fermentación.

30

Un método alternativo para estimar la concentración de la carga de HIC se determinó mediante densitometría, aunque se reconoció que esta estimación daría un contenido de colagenasa en lugar de una estimación de la proteína total (que podría variar entre las fermentaciones). Usando esta estrategia, las colagenasas totales se estimaron en 360 mg/l con una relación aproximada de AUX I a AUX II estimada en 40:60. Utilizando estos datos, la colagenasa total esperada en la carga de HIC sería de 7,2 g, lo que da un rendimiento de la etapa del 47%.

35

El cromatograma resultante de la etapa de HIC se muestra en la figura 70. El pigmento visible fue evidente en el flujo continuo, así como unido a la columna. Después de lavar la columna con el amortiguador de equilibrio para eliminar la contaminación de flujo continuo, el pico 1 se eluyó utilizando una solución de sulfato de amonio de concentración intermedia (0,3 M).

40

Se demostró que este pico contenía contaminantes de proteínas, aunque en esta etapa también se eluyó algo de AUX II (figura 71). Esta pérdida de producto se esperaba y se había señalado anteriormente. Con el fin de minimizar la cantidad de producto perdido, sin comprometer la pureza, el volumen de elución para la eliminación del pico 1 se estableció en 5 volúmenes de columna. El pico 2, que contiene la mayor parte del producto, se eluyó a continuación utilizando un amortiguador sin sulfato de amonio. El pico 2 se recolectó como un grupo único con el método de cromatografía programado de manera que la recolección comenzó después de que se aplicara a la columna ¾ de un volumen de columna de amortiguador de elución. La recolección se terminó después de que se hubieran recolectado un total de 4 volúmenes de columna. Con el fin de minimizar la potencial proteólisis en el producto en esta etapa del proceso, se añadió leupeptina al eluato post HIC y el material se mantuvo a 2-8 °C. El tiempo de espera para el eluato post HIC fue de 2 días de duración.

45

50

Filtración de flujo tangencial 1 (TFF1)

55

Se introdujo TFF utilizando membranas de 30 kDa después de la HIC para reducir el volumen de producto (5 veces) y para intercambiar el amortiguador en condiciones adecuadas para unirse a la columna de intercambio aniónico. De particular importancia fue la reducción suficiente en el sulfato de amonio, de modo que la conductividad de la muestra de carga de IEX fue <1,8mS. El amortiguador de diafiltración se enfrió y se añadió leupeptina antes de su uso para reducir la probabilidad de proteólisis. No se estimó ninguna pérdida de proteína en el transcurso de esta etapa (> 100% de recuperación), aunque esto puede reflejar la inexactitud en la estimación de la concentración de proteína en esta etapa del proceso debido a la presencia de pigmento en el material pre TFF1. Aproximadamente el 97,5% de la proteína total (3325 mg) se recuperó en el retenido con 204,8 mg adicionales recuperados en el primer enjuague de membrana (*infra*). La filtración de la proteína total del producto retenido y el enjuague combinados se realizó al final de la etapa de TFF antes de mantener el material durante la noche a 2-8 °C. El análisis de SDS-PAGE indicó que no se detectaron diferencias significativas antes y después de la etapa de TFF (figura 71).

Cromatografía Q-Sepharose

La columna de Q-Sepharose se cargó a una capacidad máxima de 5 mg de proteína total por ml de resina. Como resultado, no se utilizó todo el material disponible de la etapa TFF en esta etapa (consulte la Tabla 421). La columna de Q-Sepharose resolvió las colagenasas AUXI y AUXII como se esperaba (figura 72). El inicio de la elución de AUXII comenzó a aproximadamente 13,6% de B (donde el amortiguador A = Tris 10 mM, leupeptina 0,2 mM pH 8 y el amortiguador B = Amortiguador A + NaCl 360 mM) que equivalía a una conductividad posterior a la columna de 5,7mS. Las fracciones (100 ml) se recolectaron a lo largo de la elución de AUXII hasta que el valor de absorbancia se redujo al 25% de la altura máxima (550 U mA). Se eluyó un pequeño pico a aproximadamente 8 mS (20,3% de B) después de la elución de AUXII. El análisis en proceso de este pico de experimentos previos a pequeña escala indicó que se trataba de material agregado derivado de AUXII. El inicio de la elución de AUXI fue aproximadamente del 27% de B (lo que equivale a 10,4 ms). Como antes, se recogieron fracciones de 100 ml hasta que la absorbancia cayó al valor requerido del 25% (190µUA).

Cada fracción de AUXI y AUXII recolectada se analizó mediante SDS-PAGE y se sometió a densitometría (figuras 73-76). La densitometría se realizó de forma retrospectiva, por lo que la decisión sobre el agrupamiento de fracciones se basó en la experiencia de los niveles de contaminantes visibles mediante la tinción con azul coloidal. En colaboración con Auxilium, las fracciones 6-12 se agruparon para el producto AUXII, y las fracciones 19-26 se agruparon para AUXI. Los rendimientos de las etapas y las concentraciones de proteína presentes en el material agrupado de la ejecución con Q-Sepharose se incluyen en la tabla 42.

El análisis de SDS-PAGE de los productos AUXI y AUXII post IEX de la ejecución de demostración de 20 l (figura 77 y 78) mostró pocos contaminantes visibles por SDS-PAGE. Además, los contaminantes detectados estaban de acuerdo con experimentos previos a pequeña escala, aunque se observaron diferencias en la resolución de los contaminantes, que parecía estar más definido (es decir, picos o desniveles separados) en el modelo a pequeña escala. Estos contaminantes también fueron diferentes a los identificados para el Proceso 2 en los que clostripaína y gelatinasa habían sido componentes principales. Como resultado, los protocolos de control de calidad desarrollados para el Proceso 2 no se optimizaron para la detección de los nuevos contaminantes asociados con el Proceso 3.

La densitometría retrospectiva del material agrupado estimó la pureza en 95,1% para AUXI y 99,4% para AUXII. Actualmente, sin embargo, la especificación de pureza de ≥97% se especifica mediante RP-HPLC y no se ha establecido ninguna especificación de producto final utilizando densitometría.

Concentración e intercambio de amortiguadores de UXI y UXII

Los productos separados AUXI y AUXII de la columna Q Sepharose se procesaron por separado mediante TFF utilizando una membrana de 30 kDa. Esta etapa fue necesaria para; (i) eliminar/reducir la leupeptina en el producto final (ii) formular los intermedios en el amortiguador correcto (Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH 8) y (iii) para lograr la concentración de proteína diana requerida de 0,9-1,1 mg/ml. Se concentraron un total de 799 mg (~ 683 ml a 1,17 mg/ml) de AUXII y 860 mg (796 ml a 1,08 mg/ml) de AUXI hasta una concentración objetivo de 1,75 mg/ml. Esta concentración teórica se basó en la reducción calculada en el volumen requerido, asumiendo que no hubo pérdida de producto durante la etapa de concentración. A continuación, se realizó una diafiltración en el amortiguador de formulación requerido, las membranas se lavaron con el volumen mínimo del sistema TFF (~ 250 ml) y la cantidad total se combinó con el concentrado para lograr la concentración objetivo requerida de 0,9-1,1 mg/ml. Estuvieron disponibles después de la filtración, un total de 819,5 mg de AUXII (a 1,03 mg/ml) y 797,0 mg de AUXI (a 1,09 mg/ml). En ambos casos, la mayoría del producto se recuperó en el retenido y se estimó en 95,4% (762 mg) para AUXII y 83,1% (715 mg) para AUXI. El material adicional proporcionado por el enjuague de membrana se estimó en 153 mg y 89,6 mg para AUXII y AUXI respectivamente.

Mezcla de intermedios a la sustancia farmacéutica

Se combinaron aproximadamente 200 mg de cada intermedio para dar 400 mg de la sustancia farmacéutica. A continuación, se filtró y se proporcionaron aproximadamente 26 mg a control de calidad para su análisis. Los resultados de control de calidad (QC) para los intermedios AUX I, AUX II y la sustancia farmacéutica se proporcionan en la Tabla 43. Todas las pruebas en la sustancia farmacéutica y el intermedio AUXII pasaron la especificación requerida. Sin embargo, la prueba de potencia del intermedio AUXI, no estaba dentro del intervalo especificado, aunque todas las demás pruebas pasaron. Con la excepción del resultado de la potencia de AUXI, estos datos indicaron que el Proceso 3 fue capaz de generar material de la especificación requerida cuando se purificó en la escala de 20 l.

Además de las pruebas de control de calidad, el material de la ejecución de demostración de 20 L se utilizó para la validación del método en KBI BioPharma, Inc. A solicitud del cliente, se enviaron 200 mg de sustancia farmacéutica en hielo seco a KBI para la validación de los métodos de la sustancia farmacéutica y producto farmacéutico. La última prueba se realizó después de la liofilización de la sustancia farmacéutica en KBI. Además, se suministraron 25 mg de cada intermedio a KBI para la validación de los métodos analíticos.

Los rendimientos de etapas individuales para la ejecución de demostración de 20 L se muestran en la tabla 42. Una extrapolación de los datos en los que todo el material disponible se había cargado en la columna de Q-Sepharose indicó que la cantidad máxima total de sustancia farmacéutica disponible de este proceso se ejecutó a través de 1,6 g (suponiendo que no haya pérdida de material a través de retenciones). Esto equivale a un rendimiento global aproximado del proceso del 17,8% basado en la estimación inicial de 9 g (utilizando el ensayo Bradford) para la cantidad de proteína total disponible para cargar en la columna de HIC. Con la limitación en la carga para la columna Q-Sepharose, estaría disponible un máximo de 1,4 g de sustancia farmacéutica en la ejecución actual si todos los intermedios disponibles se hubieran mezclado para formar la sustancia farmacéutica.

Tabla 42

Etapas del proceso	Concentración de proteína (mg/ml)	Cantidad (peso/volumen)	Proteína total (mg)	Rendimiento de la etapa
Fermentación	-	200 l	-	-
Pre Mustang Q	-	22 l		
Post Mustang Q	0,45 (Bradford)	22 l	9000	-
Carga de HIC	0,30* (teórico)	30 l	9000	100
Pico 2 de HIC (después de leupeptina)	0,56	6101,7 ml	3416,95	38
Pre TFF1	0,54	6317,7 ml	3411,6	100
Post TFF1 (con 1 lavado y post filtración)	2,55	1378,5 g	3515,2	>100 %
Carga de Q (5 mg/ml de resina)	2,55	1216 ml	3100,8	100
Grupo Q AUXII	1,17	682,8 ml	798,88	25,8
Grupo Q AUXII	1,08	796,4 ml	860,11	27,7
AUXII pre TFF2	1,17	682-80 ml	798,88	100
AUXII intermedio (post filtración)	1,03	795,6 g	819,47	> 100
AUXI pre TFF2	1,08	796,40 ml	860,11	100
AUXI intermedio (post filtración)	1,09	731,2 g	797,01	92,7

* calculado en función del factor de dilución después de la adición de sulfato de amonio

Tabla 43

Ensayo	Método	Sustancia farmacológica (AXS2006A0754H)	Intermedio AUX I (AXS2006A0745H)	Intermedio AUX III (AXS2006A0737H)
Aspecto de la solución	QC SOP 001	Transparente, incolora con 2-3 pequeñas fibras exógenas de 1 mm de longitud (AK/1573/121)	Transparente, incolora y libre de partículas (AK/1573/121)	Transparente, incolora con 2-3 pequeñas fibras exógenas de 1 mm de longitud (AK/1573/121)
Medida potenciométrica del pH	QCSOP 002	7,6 (FR/1598/098)	No es necesario	No es necesario
Determinación de endotoxinas	QCSIO 018	< 0,5 UE/ml (AS/1597/128)	< 0,5 UE/ml (AS/1597/128)	0,136 UE/ml (AS/1597/128)
Identidad por SDS-PAGE teñida con Coomassie	QC SOP 103	Bandas principales de colagenasa entre 107 y 110 kDa y 110 y 115kDa (SA/1597/133)	Bandas principales de colagenasa entre 110 y 115 kDa (SA/1597/133)	Bandas principales de colagenasa entre 107 y 110 kDa (SA/1597/133)

ES 2 992 881 T3

Ensayo	Método	Sustancia farmacológica (AXS2006A0754H)	Intermedio AUX I (AXS2006A0745H)	Intermedio AUX III (AXS2006A0737H)
Proteínas totales por Espectrofotometría de Absorbancia	QC SOP 144	1,04 mg/ml (AS/1597/106)	1,11 mg/ml (AS/1597/106)	0,90 mg/ml (AS/1597/106)
Ensayo de Colágeno del Tendón de la Cola de Rata para determinar la Potencia	QC SOP 105	2326 (1700 - 3500) (AS/1597/124)	1483 (1900-3300) (AS/1597/124) (OOS/Keele/2006/0038)	No es necesario
Referencia		2097 (2014 - 3440)	2097 (2014 - 3440)	
Potencia para las Colagenasas de Clase II	QC SOP 106	57677 unidades GPA/mg (50000 - 90000) (SA/1597/111)	No es necesario	119552 unidades GPA/mg (79000 - 170000) (SA/1597/111)
Referencia		69523 unidades GPA/mg (58000 - 95000)		69523 unidades GPA/mg (58000 - 95000)
Ensayo de Proteína de Célula Hospedadora	QCSOP 107	< LOD (FR/1589/108)	No es necesario	No es necesario
Ensayo de ADN de Célula Hospedadora	Externo	NewLab	No es necesario	No es necesario
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad pureza por cromatografía de exclusión por tamaño)	QC SOP 109	100% de picos principales (47,70% AUX-I, 52,30 % AUX- II) (AK/1573/122)	100 % de picos principales 0 % de agregados (AK/1573/122)	100% de picos principales 0 % agregados (AK/1573/122)
Referencia		AUX-I 100 % AUX-II 100 %	AUX-I 100 %	AUX-II 100 %
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad y pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	QC SOP 109	48,89 % AUX-I 50,99 % AUX-II 0,12 % Otros (AK/1573/125)	99,14 % AUX-I 0,37 % AUX-II 0,49 % Otros (AK/1573/125)	0,39 % AUX-I 99,35 % AUX-II 0,26 % Otros (AK/1573/125)
Referencia		AUX-I 93,92 %, AUX-II 4,96 %, Otros 1,13 % AUX-II 100 %	AUX-I 93,92 %, AUX-II 4,96 %, Otros 1,13 %	AUX-II 100 %
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (Gelatinasa por cromatografía de intercambio aniónico)	QC SOP 109	0,3% de Gelatinasa (AK/1573/131)	0,4 % de Gelatinasa (AK/1573/131)	0 % de Gelatinasa (AK/1573/131)
Referencia		AUX-I 0% de Gelatinasa AUX-II 0% de Gelatinasa	AUX-I 0% de Gelatinasa AUX-II 0% de Gelatinasa	AUX-I 0% de Gelatinasa AUX-II 0% de Gelatinasa
Mapeo de péptidos por Digestión Triptica y HPLC de Fase Inversa	QC SOP 110	No es necesario	Martes	Martes
Leupeptina Residual	QCSOP 141	No detectada <0,5% p/p (AK/1573/136)	No es necesario	No es necesario
Carga biológica	QCSOP 223	0 ufc/5 ml (JM/1505/115)	0 ufc/5 ml (JM/1505/114)	0 ufc/5 ml (JM/1505/112)

Estudio de estabilidad de la muestra

5 Durante la ejecución de demostración de 20 l, se tomaron muestras en los puntos clave del proceso. Dado que la ejecución de demostración se realizó como un proceso continuo (sin etapas de espera), se intentó evaluar la estabilidad del material en proceso durante los tiempos de espera anticipados para lotes de GMP. La duración extendida de la ejecución esperada para GMP se reconoció debido al requisito de obtener datos de aclaramiento del equipo entre las etapas del proceso. El material en proceso se mantuvo a 2-8 °C durante aproximadamente la duración esperada para la fabricación de GMP. Además, se mantuvieron muestras durante un tiempo prolongado que representa dos veces lo esperado para la campaña de GMP. Una descripción de las muestras tomadas, junto con los respectivos tiempos de espera se da en la tabla 44. Los tiempos de procesamiento para la ejecución de demostración de 20 l se representan en la tabla 45. Todas las muestras fueron enviadas a QC para SDS-PAGE, RP- HPLC, SEC-HPLC y análisis con UV (Figuras 79-83).

10

En general, los resultados no mostraron un deterioro detectable en el producto con respecto al primer punto de espera con respecto a la pureza (según lo determinado por RP-HPLC), la degradación (según lo detectado por SDS-PAGE de Tris-Glicina al 8%) y la agregación (según lo determinado por SECHPLC). Algunos de los ensayos, sin embargo, fueron reconocidos como limitantes ya que los componentes de baja masa molecular no serían detectados por SDS-PAGE al 8% y el ensayo RPHPLC no se había desarrollado para detectar los contaminantes de 40 kDa, 55 kDa y 90 kDa asociados con el Proceso 3. Algunos ensayos también fueron menos relevantes para muestras brutas, como el uso de UV y SEC-HPLC en las muestras de fermentación. A pesar de estas limitaciones, el único cambio detectado en el perfil del producto se identificó para el segundo punto de espera (día 12) para la muestra en proceso de AUXII tomada de la columna Q-Sepharose. Esto mostró un aumento en el nivel agregado entre el día 5 y el día 12, aunque este aumento fue solo de 0 a 0,62%.

Se realizó un segundo estudio de estabilidad en las retenciones en proceso que se tomaron en el punto de fabricación durante la ejecución de demostración de 20 litros y se almacenaron a -20 °C. En este estudio, las muestras se descongelaron e incubaron a temperatura ambiente ya 37 °C y se monitorizaron mediante un análisis de SDS-PAGE al 4-12% para permitir evaluar el intervalo de masa molecular total de contaminantes (figuras 84-88). Estos datos demostraron que las muestras antes del intercambio aniónico de Q-Sepharose eran vulnerables a la degradación. Después de la separación de las colagenas AUXI y AUXII (por la columna de Q-Sepharose), las muestras parecían ser relativamente estables y parecían comparables a las muestras de tiempo cero por SDS-PAGE.

Tomados en conjunto, ambos estudios indican que siempre que la temperatura se mantenga entre 2-8 °C, no se espera que el material en proceso se deteriore durante el procesamiento durante los tiempos de espera investigados. Esto da un nivel de confianza de que el uso de leupeptina y el control de la temperatura son suficientes para restringir los niveles de degradación del producto durante el procesamiento durante las duraciones previstas en GMP.

Tabla 44

Muestra	Duración mantenida a 2-8 °C antes de la congelación	Volumen	Almacenar, Conservar	Recipiente
Filtrado de Fermentación	Día 4	1 x 2 ml	-70 °C	Bolsa
	Día 5	1 x 2 ml		
Post Mustang Q	Día 4	1 x 2 ml	-70 °C	Bolsa
Post HIC	Día 3	1 x 2 ml	-70 °C	Bolsa
	Día 6	1 x 2 ml		
Post TFF	Día 2	1 x 2 ml	-70 °C	Bolsa
	Día 4	1 x 2 ml		
Post IEX AUX I	Día 5	2 x 1 ml	-70 °C	Biotainer
	Día 12	2 x 1 ml		
Post IEX AUX II	Día 5	2 x 1 ml	-70 °C	Biotainer
	Día 12	2 x 1 ml		
AUX I intermedio	Día 6	2 x 1 ml	-70 °C	Biotainer
	Día 12	2 x 1 ml		
AUX II intermedio	Día 6	2 x 1 ml	-70 °C	Biotainer
	Día 12	2 x 1 ml		

Tabla 45

Etapa del proceso	Ejecución de demostración de 20 l
Cosecha de fermentación	Día 1
Mustang Q	Día 1
HIC	Día 2
TFF1	Día 5
IEX (Q-Sepharose)	Día 6
TFF2 (AUXI)	Día 7
TFF2 (AUXII)	Día 9
Mezcla de DS	Día 12

Estudio de estabilidad del amortiguador

Las muestras de amortiguador ilustradas en la tabla 46 se reservaron de la demostración de 20 l y se volvieron a analizar después del almacenamiento a 2-8 °C. El pH, la conductividad, la temperatura y el aspecto de los amortiguadores se observaron en el momento de la finalización y después de 12-13 días de almacenamiento. Los resultados de este estudio se dan en la tabla 47. Se observaron pequeñas diferencias en los valores de pH y

ES 2 992 881 T3

- 5 conductividad, pero esto puede deberse a diferencias de temperatura entre los amortiguadores originales y las retenciones analizadas. En particular, los amortiguador de HIC mostraron la mayor variación en conductividad y temperatura. Como resultado, los estudios futuros sobre la estabilidad del amortiguador deben incluir la especificación de un intervalo de temperatura aceptado para registrar todos los parámetros. En todos los casos, las retenciones del amortiguador tenían una apariencia clara en el momento cero y después del tiempo de retención requerido.

Tabla 46

AMORTIGUADOR	CONSTITUYENTES
HIC A	Tris 10 mM, sulfato de amonio 1,0M, pH 8,0
HIC A2	Tris 10 mM, sulfato de amonio 0,3 M, pH 8,0
HIC B	Tris 10 mM, pH 8,0
DIAFILTRACIÓN	Tris 10 mM, leupeptina 200 µM, pH 8,0
IEX A	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, leupeptina 200 µM, pH 8,0
IEX B	Tris 10 mM, CaCl ₂ 3 mM, leupeptina 200 µM, NaCl 360 mM pH 8,0
LIMPIEZA DE IEX	Tris 10 mM, CaCl 3 mM ₂ , NaCl 1,5 M a pH 8,0
FORMULACIÓN	Tris 10 mM, sacarosa 60 mM pH 8,0
LOTE DE SULFATO DE AMONIO 3,0M	Tris 10 mM, sulfato de Amonio 3,0M, pH 8,0

10

Tabla 47

Amortiguador	Fecha Preparada	Fecha de prueba	Cantidad de días transcurridos	pH y cond. de amortiguador originales	pH y conductividad de las muestras retenidas	Repetición de las pruebas de pH y cond. Muestras sin retención	Aspecto del amortiguador
HIC A	02 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	13 días	pH 7,98 127,6 mS a 17,8 °C	pH 8,10 137,5 mS a 15,8 °C	pH 7,89 134,9 mS a 22,0 °C	Transparente
HIC A2	02 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	13 días	pH 8,03 52,7 mS a 18,5 °C	pH 8,05 49,7 mS a 15,1 °C	pH 7,85 49,6 mS a 22,0 °C	Transparente
HIC B	02 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	13 días	pH 8,06 0,699 mS a 19,4 °C	pH 7,78 0,879 mS a 16,7 °C	pH 7,81 0,842 mS a 22,1 °C	Transparente
Amortiguador de diafiltración	02 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	13 días	pH 8,05 0,668 mS a 19,2 °C	pH 7,70 0,793 mS a 18,2 °C	N/E	Transparente
IE.XA	03 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	14 días	pH 8,00 1,585 mS a 20,3 °C	pH 7,69 1,646 mS a 18,2 °C	N/E	Transparente
IEX B	03 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	14 días	pH 8,00 34,6 mS a 19,4 °C	pH 7,87 37,6 mS a 18,8 °C	N/E	Transparente
Limpieza de IEX	03 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	14 días	pH 8,00 105,2 mS a 19,0 °C	pH 7,95 122,9 mS a 18,3 °C	N/E	Transparente
Formulación	03 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	14 días	pH 7,97 0,735 mS a 18,5 °C	pH 7,89 0,987 mS a 19,1 °C	N/E	Transparente
Amortiguador	Fecha Preparada	Fecha de prueba	Cantidad de días transcurridos	pH y cond. de amortiguador originales	pH y conductividad de las muestras retenidas	Repetición de las pruebas de pH y cond. Muestras sin retención	Aspecto del amortiguador
Lote de SA 3,0M	03 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	14 días	pH 7,95 251,0 mS a 16,5 °C	pH 7,96 255 mS a 19,9 °C	N/E	Transparente
Lote de SA 3,0M	04 de mayo de 2006	15 de mayo de 2006	15 días	pH 8,00 224,0 mS a 14,6 °C	pH 7,97 254 mS a 20,4 °C	N/E	Transparente

Identificación de contaminantes mediante secuenciación N-terminal

Se detectaron tres impurezas principales para el Proceso 3 mediante análisis de SDS-PAGE. Estos parecían estar coeluidos con las colagenasas AUXI y AUXII y solo se resolvieron mediante el fraccionamiento de los picos eluidos de la columna Q-Sepharose. Los contaminantes fueron asignados por su masa molecular aparente en SDS-PAGE como contaminantes de 40 kDa, 55 kDa y 90 kDa. Las fracciones con niveles elevados de un contaminante particular se enviaron para la secuenciación N-terminal después de la escisión de la banda de SDS-PAGE.

El análisis de secuencia fue exitoso tanto para el contaminante de 55 kDa como para el de 40 kDa aislados de la ejecución de demostración de 20 I. El extremo N-terminal de la banda contaminante de 55 kDa asociada con AUX I (Carriles 1-5; figura 89) mostró que coincide con una región de la secuencia de Col G para la colagenasa AUX I, mientras que la banda contaminante de 40 kDa de AUX II (Carriles 6-10; figura 89) fue idéntica a una región de la secuencia de Col H para colagenasa AUX II. Se realizó un intento previo para secuenciar la banda de 90 kDa asociada con los productos AUXI y AUXII (figura 90). La secuenciación del contaminante de 90 kDa asociado con el producto AUXI fue exitosa, ya que la identidad se correlacionó con el extremo N de la secuencia AUXI. Por el contrario, no fue posible obtener una secuencia completa para el contaminante de 90 kDa asociado con AUXII, lo que sugería que los dos contaminantes de 90 kDa eran productos diferentes.

Los principales contaminantes asociados con el Proceso 3 parecían estar relacionados con el producto y se identificaron como productos escindidos del extremo N de AUXI (55kDa) y AUXII (40kDa) o un producto escindido del extremo C de AUXI (90kDa). Como estos contaminantes eran diferentes de los identificados en el Proceso 2, los ensayos de control de calidad utilizados para la especificación de los compuestos intermedios y la sustancia farmacéutica no resolvieron los nuevos contaminantes, ya que el desarrollo del ensayo se originó en torno al Proceso 2. En particular, el ensayo de pureza convencional (RP-HPLC) no pudo usarse para detectar los niveles de los contaminantes de 40 kDa y 55 kDa.

Análisis de densitometría

Ejecución de demostración de 20 I

Los contaminantes de 40 kDa, 55 kDa y 90 kDa asociados con el Proceso 3 se identificaron y resolvieron mediante SDS-PAGE. Estos contaminantes se detectaron claramente en las fracciones eluidas de la columna de Q-Sepharose y parecían eluirse en los bordes anterior y posterior del perfil del pico (véanse las figuras 72-76). La decisión sobre qué fracciones se incluyeron o excluyeron para una purificación adicional se basó en la experiencia de la intensidad relativa de la tinción para contaminantes y el producto en geles teñidos con azul Coloidal. Con el fin de hacer de esta una estimación menos subjetiva, se utilizó densitometría para determinar los criterios de agrupación específicos para las fracciones después de la etapa de Q-Sepharose. La densitometría se usó con preferencia al ensayo de control de calidad actual para la pureza (RP-HPLC), ya que este ensayo no pudo resolver los nuevos contaminantes asociados con el Proceso 3.

Datos de densitometría de fracciones post Q de la ejecución de demostración de 20 I

Los valores de densitometría de 2 análisis separados de las fracciones post-IEX se promediaron y se muestran en la tabla 48. Las fracciones 1-12 y el último 25% (cola) del pico 1 contienen AUXII y las proteínas contaminantes asociadas de 40, 75 y 90 kDa. Las fracciones 13-27 y el último 25% (cola) del pico 2 contienen AUXI y los contaminantes asociados de 55 y 90 kDa. Los grupos de las fracciones seleccionadas, basados en SDS-PAGE sin análisis densitométrico, se resaltan.

Tabla 48

Número de fracción	Porcentaje relativo (%) de la intensidad de la banda			
	AUXII	40	75	90
1	55,9	44,1	0	0
2	57,8	42,2	0	0
3	68,0	32,0	0	0
4	83,2	16,8	0	0
5	93,3	6,7	0	0
6	98,3	1,7	0	0
7	100	0	0	0
8	100	0	0	0
9	100	0	0	0
10	98,1	0	0,7	1,2
11	94,2	0	1,9	3,3
12	94,3	0	2,2	3,5
cola	92,3	0	3,6	4,1
	AUXI	55	90	

Número de fracción	Porcentaje relativo (%) de la intensidad de la banda			
	AUXII	40	75	90
13	80,4	12,4	7,2	
14	77,8	15,3	6,9	
15	75,7	19,1	5,2	
16	74,5	20,8	4,7	
17	77,9	17,5	4,6	
18	82,0	13,7	4,3	
19	87,8	9,7	2,5	
20	93,1	3,7	3,2	
21	94,1	3,0	2,9	
22	92,4	2,8	4,8	
23	94,7	0,9	4,4	
24	95,8	0,1	4,2	
25	93,6	0,1	6,2	
26	91,5	0,0	8,4	
27	90,0	0,1	9,8	
cola	88,6	0,5	10,8	

Documentos de resumen de densitometría de las fracciones post Q de la prueba de demostración de 200L

Resumen del análisis densitométrico

5

Las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de ingeniería de 200 I se analizaron varias veces para establecer un criterio de agrupación que se pueda documentar en el BMR de IEX para la campaña GMP. Este criterio de agrupación se basa en el supuesto de que (i) la calidad del material generado a partir de la ejecución de ingeniería es apropiada para el material GMP y (ii) la aproximación del método de densitometría es aceptable. Si el objetivo es generar material de mayor calidad en la campaña GMP, será necesario revisar la especificación de los criterios de agrupación.

10

Especificación para la puesta en común del IEX

15

En total, las muestras de la ejecución de diseño de 200 I se analizaron 6 veces (2 operadores y 3 repeticiones de cada gel) y se enviaron los datos promedio en la tabla 49. Se resaltan en rojo las fracciones que se agruparon para la ejecución de diseño. A partir de este análisis, se pueden establecer los siguientes criterios de agrupación:

20

(i) Se puede agrupar cualquier fracción de pureza mayor o igual al 88,5%

(ii) No se puede agrupar cualquier fracción con una sola impureza mayor o igual al 10% no se puede agrupar

(iii) Las fracciones a agrupar deben ser de fracciones consecutivas.

25

(iv) La pureza teórica calculada del pool deberá ser:

Mayor de o igual a 93% de pureza teórica para AUXI

Mayor de o igual a 96% de pureza teórica para AUXII

30

Este último punto se basó en las estimaciones de la ejecución de diseño de 200 I en la que se estimó la proteína total en las fracciones disponibles (aunque una limitación fue que no todas las fracciones estaban presentes para el análisis UV para AUXI). Los datos de este análisis se presentan en la tabla 50.

35

** NOTA: de estos criterios, la fracción 7 para el pico de AUXII se excluiría a continuación.

Variación del ensayo

40

A partir de los datos de las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 L, se ha estimado el siguiente nivel de precisión:

(i) para el producto (AUXI y AUXII) el % de VC se calculó como 2,1% (AUXI) y 2,3 % (AUXII). Por lo tanto, la especificación de pureza del 88,6% para la agrupación podría estar en el intervalo de 86,3-90,9%.

45

(ii) para las impurezas, el % de VC es mucho mayor y el intervalo se ha estimado en 18,5%-33,7% dependiendo de la impureza. En consecuencia, la especificación de pureza de exclusión de fracciones con una sola impureza no mayor al 10 % podría ser para fracciones con un rango de impureza real de

6,63 - 13,37 %. Por lo tanto, el valor de la pureza del producto (y no las impurezas) es el valor más confiable para la especificación de agrupamiento.

Pureza estimada del material final por densitometría

El análisis densitométrico del material final (DS e intermedios) para la serie de ingeniería de 200L también se determinó mediante densitometría y es el siguiente:

AUXI = 96,0% (3,1% del contaminante de 90kDa)

AUXII = 98,7% (1,2% del contaminante de 90kDa)

DS = 97,6% (2,1% del contaminante de 90kDa)

(Nota: Este es el intervalo determinado para una única SDS-PAGE analizada 3 veces por 3 operadores diferentes.)

Normalización del método

En el transcurso del análisis de repetición, el método de densitometría se normaliza para minimizar el error entre los operadores y la variación entre geles y se documentará en un SOP. Más en particular:

- (i) La carga estándar de proteína total en cada carril del gel será de 1 µg.
- (ii) Se seleccionará un máximo de 16 fracciones para el análisis de cada uno de los picos del producto (AUXI y AUXII). Esto limitará el número de geles para el análisis de densitometría a 4.
- (iii) Las 16 fracciones seleccionadas comenzarán en la última fracción a recolectar para cada pico y avanzarán consecutivamente. Esto es para garantizar la precisión en la cifra calculada para la pureza promedio (ya que es probable que se incluyan todas las fracciones a agrupar).

Tabla 49: Las cantidades relativas promedio de producto e impurezas en las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 l, según lo determinado por el análisis de densitometría. Las fracciones agrupadas se resaltan en rojo.

N.º de Fracción	Cantidad cargada (µg)	Cantidad relativa				(%)	
		Producto	40	90	80	55	
AUXI (pico 2)							
3	1	88,91	0	7,43	0	3,66	
4	1	85,81	0	7,28	0	6,91	
5	1	84,57	0	6,78	0	8,65	
6	1	80,41	0	6,96	0	12,63	
8	1	80,00	0	5,46		14,54	
9	1	80,61	0	5,53	0	13,86	
10	1	88,53	0	4,20	0	7,27	
11	1	90,43	0	4,19	0	5,39	
13	1	94,68	0	4,35	0	0,97	
14	1	94,10	0	4,94	0	0,96	
15	1	93,93	0	5,18	0	0,89	
16	1	93,57	0	5,83	0	0,60	
18	1	92,03	0	7,97	0	0	
19	1	91,40	0	8,60	0	0	
20	1	90,30	0	9,70	0	0	
21	1	90,14	0	9,86	0	0	
AUXII (pico 1)							
	Cantidad cargada (mg)	Cantidad relativa				(%)	
		Producto	40	90	80	55	

N.º de Fracción	Cantidad cargada (µg)	Cantidad relativa				(%)	
		Producto	40	90	80	55	
AUXI (pico 2)							
3	1	68,48	21,55	9,97	0	0	
4	1	55,51	36,80	7,69	0	0	
5	1	55,90	36,73	4,96	2,41	0	
6	1	67,59	25,09	4,53	2,79	0	
7	1	80,70	12,33	4,41	2,55	0	
8	1	87,61	5,18	4,58	2,62	0	
9	1	100	0	0	0	0	
10	1	100	0	0	0	0	
11	1	100	0	0	0	0	
12	1	100	0	0	0	0	
13	1	95,59	0	2,92	1,49	0	
14	1	93,56	0	4,12	2,31	0	
es	1	91,90	0	5,05	3,05	0	
16	1	91,45	0	4,88	3,67	0	
17	1	89,95	0	5,57	4,48	0	
18	1	87,85	0	7,03	5,11	0	

Tabla 50: Las cantidades relativas teóricas de producto e impurezas en las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 I, según lo determinado por el análisis de densitometría. Las fracciones agrupadas se resaltan en rojo. La pureza teórica promedio del producto se calcula como 92,3% y 95,8% para los intermedios AUXI y AUXII respectivamente.

5

	Cantidad de proteína total (mg)	Cantidad de producto (AUXI) (mg)	Cantidad de todas las impurezas (mg)
AUXI			
	954,09	844,67	109,42
	1290,61	1167,07	123,55
	1524,29	1443,16	81,13
	1507,35	1418,46	88,89
	1339,47	1258,18	81,29
	1256,06	1175,32	80,74
	1063,30	978,57	84,73
	972,75	889,05	83,70
	774,62	699,46	75,15
	588,06	530,06	58,00
Total	11270,60	10404,00	866,60
%		92,31	7,69
	Cantidad de proteína total (mg)	Cantidad de producto (AUXII) (mg)	Cantidad de todas las impurezas (mg)
AUXII			
	200,20	161,56	38,64
	323,14	283,11	40,02
	533,02	533,02	0,00
	882,09	882,09	0,00

	Cantidad de proteína total (mg)	Cantidad de producto (AUXI) (mg)	Cantidad de todas las impurezas (mg)
AUXI			
	1226,58	1226,58	0,00
	1508,94	1508,94	0,00
	1206,73	1153,47	53,27
	943,48	882,75	60,73
	684,41	628,99	55,43
	537,35	491,40	45,95
	312,80	281,35	31,45
	348,53	306,19	42,34
Total	8707,28	8339,45	367,82
%		95,78	4,22

Criterios de agrupación GMP para fracciones posteriores a Q-Sepharose

Detalle a especificar en la BMR de intercambio iónico

- 5
1. A. Los siguientes criterios de agrupación deben especificarse para las fracciones tanto de los picos AUXI como de AUXII que se han analizado por densitometría:
 - 10 (i) Se seleccionará un máximo de 16 fracciones para el análisis de cada uno de los picos del producto (AUXI y AUXII). Esto limitará el número de geles para el análisis de densitometría a 4.
 - (ii) Se puede agrupar cualquier fracción de pureza mayor o igual al 90,00% (indicada a 2 lugares decimales).
 - 15 (iii) No se puede agrupar cualquier fracción con una sola impureza mayor o igual al 9.00% (a 2 lugares decimales).
 - (iv) Las fracciones a agrupar deben ser de fracciones consecutivas.
 - 20 2. B. Los siguientes criterios de agrupación se deben especificar para las fracciones del pico AUXII que se han analizado mediante SEC-HPLC:
 - 25 (i) El número máximo de muestras que se enviarán para SEC-HPLC es 10 y debe ser de la última fracción recolectada para este pico y las fracciones consecutivas en adelante.
 - (ii) No se puede agrupar cualquier fracción con un agregado mayor o igual al 2,00% (a 2 lugares decimales).

Detalles a ser registrados solo para información

- 30
1. A. La pureza teórica estimada de la agrupación se debe calcular solo con fines informativos y se espera que sea:
 - 35 Mayor de o igual a 93,00% de pureza teórica para AUXI
 - Mayor de o igual a 97,00% de pureza teórica para AUXII
 2. B. La cantidad mínima de proteína en cada grupo debe anotarse para establecer si podrían usarse en el futuro los criterios para excluir fracciones con menos de 0,5 g.
 - 40 3. C. Las fracciones para el pico AUXI se enviarán para RP-HPLC, pero se analizarán retrospectivamente y solo para información. Estos datos NO se considerarán como parte de los criterios de agrupación.

Impacto esperado en la agrupación

- 45
- Se ha calculado lo siguiente a partir del conjunto de datos promedio presentado en la tabla 51 para reflejar el efecto en la selección de rendimiento y fracción siguiendo los nuevos criterios de agrupación:

Tabla 51

	AUXI	AUXII
Fracciones agrupadas de la ejecución de diseño de 200 I	#10-21	#7-18
Proteína total determinada para las agrupaciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 I	13,18 g	8,37 g
Fracciones que serían agrupadas siguiendo los criterios de GMP	#11-21	#9-16
Reducción estimada en la proteína total debido a las fracciones excluidas por el GMP	0,95 g	1,18 g

5 Tabla 52: Las cantidades relativas promedio de producto e impurezas en las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 I, según lo determinado por el análisis de densitometría.

N.º de Fracción	Cantidad cargada (µg)	Cantidad relativa (%)				
		Producto	40	90	80	55
AUXI (pico 2)						
3	1	88,91	0	7,43	0	3,66
4	1	85,81	0	7,28	0	6,91
5	1	84,57	0	6,78	0	8,65
6	1	80,41	0	6,96	0	12,63
8	1	80,00	0	5,46	0	14,54
9	1	80,61	0	5,53	0	13,86
10	1	88,53	0	4,20	0	7,27
11	1	90,43	0	4,19	0	5,39
13	1	94,68	0	4,35	0	0,97
14	1	94,10	0	4,94	0	0,96
15	1	93,93	0	5,18	0	0,89
16	1	93,57	0	5,83	0	0,60
18	1	92,03	0	7,97	0	0
19	1	91,40	0	8,60	0	α
20	1	90,30	0	9,70	0	0
21	1	90,14	0	9,86	0	0
AUXII (pico 1)						
N.º de Fracción	Cantidad cargada (mg)	Cantidad relativa (%)				
		Producto	40	90	80	55
3	1	68,48	21,55	9,97	0	0
4	1	55,51	36,80	7,69	0	0
5	1	55,90	36,73	4,96	2,41	0
6	1	67,59	25,09	4,53	2,79	0
7	1	80,70	12,33	4,41	2,55	0
8	1	87,61	5,18	4,58	2,62	0
9	1	100	0	0	0	0
10	1	100	0	0	0	0
11	1	100	0	0	0	0
12	1	100	0	0	0	0
13	1	95,59	0	2,92	1,49	0
14	1	93,56	0	4,12	2,31	0
15	1	91,90	0	5,05	3,05	0

N.º de Fracción	Cantidad cargada (µg)	Cantidad relativa (%)				
		Producto	40	90	80	55
AUXI (pico 2)						
16	1	91,45	0	4,88	3,67	0
17	1	89,95	0	5,57	4,48	0
18	1	87,85	0	7,03	5,11	0

Tabla 53: Las cantidades relativas teóricas de producto e impurezas en las fracciones posteriores a IEX de la ejecución de diseño de 200 l, según lo determinado por el análisis de densitometría. Las fracciones agrupadas se resaltan en rojo. La pureza teórica promedio del producto se calcula como 92,3% y 95,8% para los intermedios AUXI y AUXII respectivamente.

5

	Cantidad de proteína total (mg)	Cantidad de producto (AUXI) (mg)	Cantidad de todas las impurezas (mg)
AUXI			
#10	954,09	844,67	109,42
#11	1290,61	1167,07	123,55
#13	1524,29	1443,16	81,13
#14	1507,35	1418,46	88,89
#15	1339,47	1258,18	81,29
#16	1256,06	1175,32	80,74
#18	1063,30	978,57	84,73
#19	972,75	889,05	83,70
#20	774,62	699,46	75,15
#21	588,06	530,06	58,00
Total	11270,60	10404,00	866,60
%		92,31	7,69
	Cantidad de proteína total (mg)	Cantidad de producto (AUXII) (mg)	Cantidad de todas las impurezas (mg)
AUXII			
#7	200,20	161,56	38,64
#8	323,14	283,11	40,02
#9	533,02	533,02	0,00
#10	882,09	882,09	0,00
#11	1226,58	1226,58	0,00
#12	1508,94	1508,94	0,00
#13	1206,73	1153,47	53,27
#14	943,48	882,75	60,73
#15	684,41	628,99	55,43
#16	537,35	491,40	45,95
#17	312,80	281,35	31,45
#18	348,53	306,19	42,34
Total	8707,28	8339,45	367,82
%		95,78	4,22

Una comparación de 2 conjuntos de datos (es decir, las mismas muestras en proceso ejecutadas en diferentes gels por diferentes operadores) permitió que se anotaran los siguientes criterios de agrupación retrospectiva para

el conjunto de datos promedio, aunque se incluiría una fracción adicional (fracción 27 de AUXI) de los que realmente se agruparon en la ejecución de 20 l:

AUXI

5

Agrupar todas las fracciones con una pureza de $\geq 87\%$ pero que no tengan una impureza única de $\geq 10\%$.

AUXII

10

Agrupar todas las fracciones con una pureza de $\geq 94\%$ pero que no tengan una impureza única de $\geq 4\%$.

Los datos de control de calidad del análisis del material final de la ejecución de demostración de 20 l mostraron que el intermedio AUXII 99,4% puro, el intermedio AUXI era 99,1% puro y la sustancia farmacéutica era 99,9% colagenasa por RP-HPLC. Por lo tanto, se esperaba que los criterios especificados para el proceso de agrupación den como resultado material que pase las especificaciones de liberación para el material final.

15

Experimento de demostración de 200 l

20

Los criterios establecidos para la ejecución de demostración de 20 l mencionada anteriormente fueron diferentes a los implementados para la ejecución de diseño de 200 l. En este caso, la agrupación se especificó para los productos tanto AUXI como AUXII como fracciones con una pureza de $\geq 86,5\%$ pero que no tenían un solo contaminante de impureza de $\geq 10\%$. También se excluyeron las muestras de AUXII con un nivel de impureza $\geq 2\%$ detectado por SEC-HPLC. Los intermedios AUXI/AUXII resultantes y la sustancia farmacéutica también se analizaron por densitometría, usando un método normalizado, y se demostró que tienen la siguiente pureza estimada basada en el análisis de un solo gel 3 veces (3 operadores diferentes): AUXI = 96,0% (3,1% del contaminante de 90kDa); AUXII = 98,7% (1,2% del contaminante de 90kDa); DS = 97,6% (2,1% del contaminante de 90kDa).

25

30

Además, se demostró que la pureza determinada de por el control de calidad de los compuestos intermedios y la sustancia farmacéutica superaba la especificación mediante el ensayo RP-HPLC (AUXI = 98,2%; AUXII = 98,1 %; sustancia farmacéutica = 99,4%). Como consecuencia, los criterios de agrupación seguidos para la ejecución de diseño de 200 L tuvieron éxito en la entrega de un producto de pureza adecuada basado en los métodos analíticos disponibles en la actualidad.

35

Materiales y métodos

Cromatografía Mustang Q (escala de 20 l)

Equipo:

40

Cápsula de cromatografía Mustang Q, 60 ml (CL3MSTGQP1, Pall)

Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)

45

Productos químicos:

Cloruro de sodio (grado USP, Merck)

Solución de hidróxido de sodio (volumétrico 4M) (AnalaR, BDH)

50

Tris (hidroximetil)metilamina (grado USP, Merck)

Sulfato de amonio (Extra Pure, Merck)

55

Agua de inyección Hyclone - Calidad de agua (API-QW)

60

Se desinfectó una cápsula de cromatografía Mustang Q de 60 ml de volumen de lecho con NaOH 1M a un caudal de 30 ml/min durante 30 minutos. La cápsula se acondicionó previamente durante el mismo tiempo y caudal utilizando NaCl 1M. La cápsula se equilibró con 2 litros de amortiguador de equilibrio Mustang Q (Tris 10 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 8), a un caudal de 60 ml/min. El flujo de salida se verificó para asegurar que el pH fuera ≤ 8 . El sobrenadante (22 l) de la fermentación de 200 l de PP3 (que se había filtrado a 0,2 μm) se cargó en la cápsula a una velocidad de flujo de 540 ml/min (aproximadamente 40 min de duración). El caudal de operación máximo recomendado para la cápsula fue de 600 ml/min. El material filtrado se almacenó en 2 bolsas Stedim de 10 l a 2-8 °C durante la noche.

65

Cromatografía de interacción hidrofóbica (escala de 20 l)

Equipo:

- 5 AKTA Pilot instalado con el software Unicorn V 5.01 (GE Healthcare)
 Columna Vantage S130 (sección transversal 125 cm², Millipore)
 Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)
- 10 Cápsula de filtro Sartopore 2 0,8+0,45 µm (Sartorius)
 Unidad de refrigeración médica MP150 (Electrolux)

Productos químicos:

- 15 Fenil Sepharose 6 FF sub bajo (GE Healthcare)
 Solución de hidróxido de sodio (volumétrico 4M) (AnalaR, BDH)
- 20 Cloruro de sodio (grado USP, Merck)
 Tris(hidroximetil)metilamina (grado USP, Merck)
 Sulfato de amonio (Extra Pure, Merck)
- 25 Leupeptina (MP Biomedicals, Inc)
 Agua para inyección Hyclone - Agua de calidad (Quality water) (API-QW)
- 30 *Empaquetamiento de las columnas de HIC*

Se sedimentaron 2400 ml de suspensión de Fenil Sepharose 6 FF Sub bajo (Lote n. ° 312089) durante 3 horas y se eliminó el etanol y se reemplazó con 1800 ml de API. El medio se volvió a suspender (50%), se sedimentó, y se lavó una vez con API y dos veces con 1800 ml de NaCl 200 mM, dejando sedimentar durante la noche entre lavados. El medio se volvió a mezclar con 1800 ml de NaCl 200 mM, se vertió en la columna y se dejó reposar durante 1 hora. El adaptador se bajó hasta ~1cm por encima del lecho de resina (eliminando todas las burbujas de aire), y el medio se empaquetó en NaCl 200 mM a un caudal de 400 ml/min (192 cm/h) durante 10 minutos. Este caudal de empaquetamiento se utilizó como equivalente al caudal operativo máximo para el sistema K-prime disponible en GMP. El adaptador se bajó hasta la parte superior del lecho y la columna se empaquetó hasta 192 cm/h durante 10 minutos antes de atornillar el adaptador en la parte superior de la resina y se empaquetó a 192 cm/hora durante otros 10 minutos, durante los cuales no se observó compresión de la resina. La prueba de empaquetamiento se llevó a cabo utilizando el método AKTA Pilot. Prueba de empaquetamiento de HIC 1500 ml. Para ello, la columna se equilibró con 1 volumen de columna (VC) de NaCl 200 mM en API y el paquete se probó con 15 ml (1% de VC) de NaCl 1 M en API a un caudal de 313 ml/min (150 cm/h). La columna se lavó con 2VC de API y se almacenó con 2VC de NaOH 10 mM. La columna empaquetada tenía una asimetría de 1,2, un recuento de placas de 2659 placas/metro, un VC de 1525 ml y una altura del lecho de 12,2 cm.

Desinfección y calibración de la columna

50 La columna Fenil Sepharose 6 FF (sub bajo) se desinfectó con NaOH 0,5 M durante 60 minutos, se lavó con 2 volúmenes de columna (VC) de API y se equilibró con 5VC 10 mM Tris, pH 8 (Amortiguador B de HIC) seguido de 5VC de Tris 10 mM, sulfato de amonio 1,0M, pH 8 (Amortiguador A de HIC).

Preparación de la carga de HIC

55 13,48 kg (11.05 litros) de sulfato de amonio 3,0 M, Tris 10 mM, se añadió pH 8 a 22,1 kg de filtrado de fermentación después del tratamiento con Mustang Q (sección 3. 1). El filtrado se mezcló durante 5 minutos antes de filtrar a través de una cápsula de filtro de 0,05 m² (0,8 + 0,45 µm). El material filtrado (indicado como material de carga de HIC) se almacenó en hielo (aproximadamente 30 minutos de duración) hasta su uso.

Ejecución de las columnas de HIC

65 La ejecución de HIC se realizó a un caudal lineal constante de 150 cm/hora utilizando amortiguadores enfriados mantenidos a 2-8 °C. Se cargaron 30 l de materia prima (equivalente a 20 l del filtrado post-Mustang Q) en la columna de Fenil Sepharose 6 FF de 1525 ml (sub bajo) equilibrada previamente con 2 VC de Tris 10 mM, sulfato de amonio 1,0M, pH 8 (Amortiguador A de HIC). El material no unido se lavó de la columna con 10VC de

amortiguador A de HIC. La columna se lavó a continuación con 5VC de Tris 10 mM, sulfato de amonio 0,3M, pH 8 (Amortiguador A2 de HIC) y las proteínas unidas se eluyeron con 10VC de Tris 10 mM, pH 8 (Amortiguador B de HIC). Los primeros 0,67 VC (1 l) del amortiguador de elución se descartaron y se recogió una agrupación post-HIC de 4VC. Se añadió leupeptina (126,4 ml) a la agrupación post-HIC (6191,3 g) a una concentración final de 200 μ M de una solución madre de leupeptina 10 mM, Tris 10 mM, pH 8. La solución mixta (6,3 kg) se almacenó a 2-8 °C durante 2 días antes del procesamiento adicional mediante filtración de flujo tangencial.

Etapa 1 de filtración de flujo tangencial (TFF1, escala de 20 l)

10 **Equipo:**

Sistema ProFlux M12 TFF (Millipore)

Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)

15 Cápsula de filtro Sartopore 2 0,8+0,45 μ m (Sartorius)

Filtro Pellicon 2 "Mini" de 0,1 m² y 30 kDa MWCO Membranas PES (Millipore)

20 Unidad de refrigeración médica MP150 (Electrolux)

Materiales/Productos químicos:

25 Solución de hidróxido de sodio (volumétrico 4M) (AnalaR, BDH)

Tris(hidroximetil)metilamina (grado USP, Merck)

Leupeptina (MP Biomedicals, Inc)

30 Agua de inyección Hyclone - Calidad de agua (API-QW)

Montaje del Sistema

35 El sistema ProFlux M12 TFF se configuró de acuerdo con las instrucciones del fabricante con dos membranas Pellicon 2 "Mini" Filter 30kDa MWCO PES, se desinfectaron con NaOH 0,5 M durante 60 minutos y se almacenaron en NaOH 0,1 M hasta su uso. El sistema se drenó y se enjuagó con 14 l de API y se midió la permeabilidad al agua normal (NWP) como 23 l/m²/h/psi a 25 °C a una presión transmembrana (TMP) de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig). El sistema se lavó con 0,5 l de Tris 10 mM, pH 8 (amortiguador de diafiltración) y se equilibró con 1 l del mismo amortiguador durante 10 minutos. La conductividad y el pH del permeado se determinaron y compararon con el del amortiguador de diafiltración para garantizar que las membranas se equilibraran antes de su uso.

Concentración y diafiltración

45 Las etapas de concentración y diafiltración se realizaron con un amortiguador de diafiltración enfriado (Tris 10 mM, pH 8) que contenía leupeptina 200 μ M. El sistema TFF se lavó con 1 l de amortiguador enfriado justo antes de su uso. Se bombearon 2 l del material post-HIC (6,3 l de volumen total) al depósito del sistema TFF y se recirculó durante 10 minutos sin contrapresión para acondicionar la membrana. El sensor de nivel en el depósito se ajustó a 1,2 L y el material post-HIC se concentró a una TMP de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig) hasta que todo el material ingresó al sistema. El permeado se recogió y almacenó a 2-8 °C para su análisis. El tubo de entrada se conectó al amortiguador de diafiltración y la diafiltración del material se realizó a una TMP de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig) para aproximadamente 8,5 volúmenes de rotación (TOV), manteniendo el volumen de material en el depósito a 1,2 l. La conductividad y el pH del permeado se determinaron después de 5, 7 y 8,5 TOV y se compararon con los del amortiguador de diafiltración. El retenido se drenó del sistema y se almacenó a 2-8 °C. Se bombearon 250 ml de amortiguador de diafiltración en el depósito, recirculado alrededor del sistema durante 10 minutos sin contrapresión para enjuagar el sistema, drenar, enjuagar de manera repetida y se almacenaron ambos enjuagues por separado a 2-8 °C. La concentración de proteína del retenido y los enjuagues se determinó (por UV) y el primer enjuague (204,8 g de peso) se agregó al retenido (1231,4 g de peso). Este material post TFF1 (1,4 kg) se filtró a continuación a través de una cápsula de filtro Sartopore 2 0,8+0,45 μ m y se almacenó a 2-8 °C durante la noche hasta el procesamiento adicional mediante cromatografía de intercambio iónico Q Sepharose.

Cromatografía de intercambio iónico (escala de 20 l)

65 **Equipo:**

AKTA Pilot instalado con el software Unicorn 5.01 (GE Healthcare)

Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)

5 Columna Vantage S90 (área de sección transversal 62 cm², Millipore)

Unidad de refrigeración médica MP150 (Electrolux)

Productos químicos:

10 Solución de hidróxido de sodio (volumétrico 4M) (AnalaR, BDH)

Cloruro de sodio (grado USP, Merck)

15 Tris(hidroximetil)metilamina (grado USP, Merck)

Cloruro de calcio 2-hidrato (grado USP, Merck)

20 Leupeptina (MP Biomedicals, Inc.)

Q Sepharose HP (GE Healthcare)

Agua de inyección Hyclone - Calidad de agua (API-QW)

25 Empaquetamiento y preparación de la columna

Se empaquetó una columna Vantage S90 utilizando un sistema de cromatografía AKTA Pilot con medios Q Sepharose HP en API para obtener una columna empaquetada con una altura de lecho de 10 cm, por lo tanto un volumen de columna (VC) de 620 ml. El empaquetamiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero con el límite de presión de la columna Vantage impuesta (0,3MPa), lo que equivale a un flujo de empaquetamiento de 210 cm³/h y un límite de presión de 0,28MPa. Después del empaquetamiento, la columna se equilibró con 2VC de NaCl 0,2 M y el paquete se probó con 1% de VC (6,2 ml) de NaCl 1 M a un caudal de 100 cm³/h (103 ml/min). La columna empaquetada tenía una asimetría de 1,6 y un recuento de placas de 12605 placas/metro, que estaba dentro de las especificaciones para los medios (asimetría entre 0,8 y 1,8, con un recuento de placas >10.000). La columna se almacenó en NaOH 10 mM hasta que se necesitó.

40 Antes de usarse, la columna de Q-Sepharose se lavó con 1,5 volúmenes de columna (VC) de API para eliminar el amortiguador de almacenamiento, se desinfectó con NaOH 0,5 M durante 60 minutos a 40 cm³/h antes de enjuagar nuevamente con 1,5 VC de API. A continuación, se cargó y se equilibró la columna de acuerdo con las instrucciones del fabricante con 2VC de Tris 10 mM, cloruro de calcio 3 mM, pH 8 seguido de 2VC de Tris 10 mM, CaCl₂ 3 mM, NaCl 360 mM, pH 8 y finalmente y 5 VC de Tris 10 mM, CaCl₂ 3 mM, pH 8.

Ejecución de columna

45 Inmediatamente antes de cargar la muestra en la columna, la columna se reequilibró con Tris 10 mM enfriado, CaCl₂ 3 mM, leupeptina 200 μM pH 8 (Amortiguador A de IEX). Se cargaron 1216 ml de material post-TFF 1 enfriado a una concentración de 2,55 mg/ml (determinada por UV) en la columna a un caudal de 100 cm³/h (103 ml/min). Esto equivale a una carga de columna de 5 mg de proteína total por ml de medio. Después de cargar el producto, la columna se lavó con 3 volúmenes de columna (VC) de Amortiguador A de IEX y la proteína se eluyó con Tris 10 mM, CaCl₂ 3 mM, NaCl 360 mM, leupeptina 200 μM, pH 8 (Amortiguador B de IEX) con un gradiente de 0-40% de amortiguador de elución (A a B), sobre 20 VC a un caudal de 70,2 ml/min (68 cm³/h). La elución se controló a 280nm y 260nm y las fracciones de 100 ml recogidas a través de los dos picos del producto que contenían AUX II y AUX I. La recolección de fracciones se inició a partir del avance del pico y continuó hasta el 25% de la altura del pico en el borde posterior. Se recogieron un total de 12 fracciones en el pico AUX II y 15 fracciones en el pico AUX I. La cromatografía Q Sepharose HP se llevó a cabo a una temperatura convencional de laboratorio de 18-23 °C, aunque los amortiguadores utilizados fueron enfriados previamente. Las fracciones se almacenaron a 2-8 °C hasta que se obtuvo un resultado del análisis de SDS-PAGE. Las fracciones 6 a 12 (pico 1) se agruparon como colagenasa AUX II con el volumen determinado como 683 g (después del muestreo) y la concentración mediante análisis UV se midió como 1,17 mg/ml. Las fracciones 19 a 26 (pico 2) se agruparon como colagenasa AUX I con el volumen determinado como 796 g (después del muestreo) y la concentración por UV se midió como 1,08 mg/ml.

Etapa 2 de filtración de flujo tangencial (TFF2, escala de 20 l)

65 **Equipo:**

Sistema ProFlux M12 TFF (Millipore)

Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)

5 Filtro Pellicon 2 "Mini" de 0,1 m² y 30 kDa MWCO con membrana PES (Millipore)

Unidad de filtrado de 90 mm (1 l) Membrana de PES de 0,2 µm (Nalgene)

10 Unidad de refrigeración médica MP150 (Electrolux)

Materiales/Productos químicos:

Solución de hidróxido de sodio (volumétrico 4M) (AnalaR, BDH)

15 Tris(hidroximetil)metilamina (grado USP, Merck)

Sacarosa (grado BP, Merck)

20 Leupeptina (MP Biomedicals, Inc.)

Agua de inyección Hyclone - Calidad de agua (API-QW)

Agua para inyección de Fresenius Kabi (API)

Configuración del Sistema

El sistema ProFlux M12 TFF se configuró de acuerdo con las instrucciones del fabricante con una membrana Pellicon 2 "Mini" Filter 30kDa MWCO PES, se desinfectaron con NaOH 0,5 M durante 60 minutos y se almacenaron en NaOH 0,1 M hasta su uso. El sistema se drenó y se lavó con 14 litros de API y la permeabilidad al agua normal (NWP) se midió como 19,5 l/m²/h/psi para la membrana utilizada para AUXI y como 14,5 l/m²/hora/psi a 25 °C para la membrana utilizada para AUXII a 25 °C y a una presión transmembrana (TMP) de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig). El sistema se lavó con 0,5 l de Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH8 (amortiguador de Formulación) y se equilibró con 1 l del mismo amortiguador durante 10 minutos. La conductividad y el pH del permeado se determinaron y compararon con los del amortiguador de formulación.

Concentración y formulación

Las etapas de concentración y diafiltración se realizaron por separado en cada uno de las agrupaciones post IEX de AUXI y AUXII. Todas las etapas se realizaron utilizando un amortiguador de formulación enfriada (Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH 8 mantenido a 2-8°C. El sistema TFF se lavó con 1 l de amortiguador enfriado justo antes de su uso. La agrupación post-IEX (683 g de peso de AUXII y 796 g de AUXI) se bombeó al depósito del sistema TFF y se hizo recircular a una velocidad de bombeo del 10% durante 10 minutos sin contrapresión para acondicionar la membrana. El sensor de nivel en el depósito se ajustó a aproximadamente 400 ml y la agrupación de AUXI o AUXII se concentró a una TMP de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig) hasta que el volumen en el depósito se redujo a aproximadamente 360-390 ml (esto supuso un sistema con un volumen de 100 ml). La reducción del volumen objetivo se basó en lograr una concentración teórica de 1,75 mg/ml para el producto, suponiendo que no haya pérdida de proteína durante la operación de concentración. El permeado se recogió y almacenó a 2-8 °C para su análisis. Para la operación de diafiltración, el tubo de entrada se conectó al amortiguador de formulación y la diafiltración se realizó a una TMP de 15 psig (presión de entrada de 20 psig y presión de salida de 10 psig). Se realizaron aproximadamente 12 volúmenes de rotación (TOV) para AUXII y 8,5 TOV para AUXI, manteniendo el volumen de material en el depósito a ~ 400 ml. La conductividad y el pH del permeado se determinaron después de 12 TOV para AUXII y después de 6, 7 y 8,5 TOV para AUXI y se compararon con los del amortiguador de formulación. El retenido se drenó del sistema y se almacenó a 2-8 °C.

55 Se usaron 250 ml de amortiguador de formulación para lavar el producto residual de las membranas mediante recirculación alrededor del sistema durante 10 minutos (sin contrapresión). Después de drenar la solución de enjuague, se realizó un segundo lavado y tanto el enjuague 1 como el enjuague 2 se almacenaron a 2-8 °C. Después de la determinación UV del contenido de proteína del retenido y los enjuagues, el primer enjuague se añadió al retenido, se mezcló y se determinó la concentración de proteína de UV de la mezcla. Para AUXII, también se agregaron 122 g del segundo enjuague al retenido más el enjuague 1 para dar una concentración teórica de AUXII de 1,1 mg/ml. Para AUXI, se agregaron 94 g del segundo enjuague al material para dar una concentración teórica de AUXI de 1,1 mg/ml. Tanto el material AUXI como el AUXII se filtraron a través de una unidad de filtro Nalgene de 0,2 µm 1 l en una campana de Clase II y se determinó la concentración de proteína postfiltrada. Los intermedios AUXI y AUXII se almacenaron a 2-8 °C.

Determinación de la concentración de proteínas

*Absorbancia**Equipo:*

5

Espectrofotómetro DU800 (Beckman)

10

En el proceso, las muestras se analizaron mediante espectrofotometría UV realizando una exploración UV de muestras entre 220 y 330 nm. El amortiguador apropiado se usó como blanco y se realizó un escaneo del blanco de amortiguador antes de escanear las muestras. Si es necesario, Las muestras se diluyeron con el mismo amortiguador para asegurar que $A_{280} < 1,0$ UA. Las concentraciones de proteína (mg/ml) se determinaron de acuerdo con la ley de Beer-Lambert, $c = A/b \cdot \epsilon$, en la que A es la absorbancia ($A_{280}-A_{330}$), b es la longitud (1,0 cm) y ϵ es el coeficiente de extinción de la proteína. Se utilizaron coeficientes de extinción de 1,48 mg-icm-imL para AUXI, 1,576 mg-icm-imL para AUXII y 1,428 mg-icm-imL para una mezcla AUXII/AUXII.

15

Ensayo de Bradford*Materiales:*

20

BSA Liofilizado (hidratado a 1,4 mg/ml)

Productos químicos:

25

Concentrado de Reactivo de Tinte de Ensayo de Proteína (500-0006, Bio - Rad)

30

Se preparó una curva patrón de BSA diluyendo BSA con agua, a concentraciones conocidas. El reactivo de tinte de ensayo de proteína Bio-Rad se preparó diluyendo una parte de concentrado con cuatro partes de agua. Las muestras de prueba se prepararon diluyendo con agua. Se añadieron 50 μ l de muestra de prueba, ya sea pura o diluida, a una cubeta y se agregaron 2,5 ml de reactivo diluido. Las muestras se prepararon por duplicado. Las muestras se incubaron durante 10 minutos antes de leer la DO. La curva patrón de DO_{595nm} frente a la concentración de proteína se obtuvo al medir la DO_{595nm} de soluciones de BSA de concentración conocida. Las muestras de prueba se ensayaron y la concentración de proteína se determinó a partir de la curva de ensayo de proteína patrón. Las muestras de la etapa posterior a Mustang Q se analizaron siempre sin dilución para estandarizar la contribución del pigmento. En este caso, se utilizaron 50 μ l del material no diluido posterior a Mustang Q en el ensayo.

35

Análisis de SDS-PAGE***Equipo:***

40

Sistema de electroforesis Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen)

Fuente de alimentación de electroforesis EPS 601, (Amersham Pharmacia Biotech)

45

Plataforma vibratoria de roca (Suministros de laboratorio científico)

Productos químicos:

50

Estándares SDS-PAGE de alto peso molecular (161-0303, Bio Rad)

Estándar sin teñir Mark12 (LC5677, Invitrogen)

Geles Novex Tris-glicina al 8 %, 1,5 mm, 10 pocillos (EC6018BOX, Invitrogen)

55

Geles NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris, 1,0 mm, 12 pocillos (NP0322BOX, Invitrogen)

Amortiguador de ejecución de SDS Tris-Glicina de Novex (10x) (LC2675, Invitrogen)

Amortiguador de Muestra NuPAGE MES SDS (20x) (NP0002, Invitrogen)

60

Amortiguador de muestra Novex Tris-Glicina SDS (2x) (LC2676, Invitrogen)

Amortiguador de Muestra NuPAGE LDS (4x) (NP0007, Invitrogen)

65

Agente reductor de muestras NuPAGE (10x) (NP0009, Invitrogen)

Kit de tinción de azul Coloidal (LC6025, Invitrogen)

Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético Analar R (BDH)

5 **Geles de Tris-Glicina**

Las muestras se prepararon para la SDS-PAGE reductora mediante la adición de 12 µl de muestra a 20 µl de amortiguador de muestra (2x), 4 µl de agente reductor (10x) y 4 µl de EDTA 0,1M (para lograr una concentración final de 10 mM). El marcador de alto peso molecular (HMW) se preparó agregando 10 µl de solución madre concentrada a 80 µl de agente reductor (10x), 310 µl de API y 400 µl de amortiguador de muestra (2x). El HMW diluido convencional se calentó a continuación a 95 °C durante 5 minutos antes de hacer alícuotas y se almacenó a -20 °C para su uso en geles posteriores. Las muestras (volumen de carga de 20 µl) que contenían colagenasas se ejecutaron directamente (es decir, sin tratamiento térmico previo) en geles de Tris-Glicina al 8% utilizando amortiguador de ejecución de tris-glicina a 130 V durante ~2 horas. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con un reactivo de tinción azul coloidal según las instrucciones del fabricante.

Geles de Bis-Tris

Las muestras se prepararon para la SDS-PAGE reductora mediante la adición de 16,5 µl de muestra a 7,5 µl de amortiguador de muestra (4x), 3 µl de agente reductor (10x) y 3 µl de EDTA 0,1M (para lograr una concentración final de 10 mM). Marcador MARK 12 cargado puro (10 µl). Las muestras (15 µl de volumen de carga) que contenían colagenasas se procesaron directamente (es decir, sin tratamiento térmico previo) en geles de Bis-Tris al 4-12% utilizando un amortiguador de ejecución MES a 200 V durante ~40 minutos. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con un reactivo de tinción azul coloidal según las instrucciones del fabricante o con tinción de plata usando un procedimiento convencional (GE Healthcare).

Análisis densitométrico de fracciones post-IEX

Equipo:

30 Sistema de electroforesis Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen)
Fuente de alimentación de electroforesis EPS 601, (Amersham Pharmacia Biotech)
35 Plataforma agitadora Rocky, (Scientific Laboratory Supplies) Escáner plano (Hewlett Packard)

Materiales/Productos químicos:

40 Geles NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris, 1,0 mm, 12 pocillos (NP0322BOX, Invitrogen)
Amortiguador de Muestra NuPAGE MES SDS (20x) (NP0002, Invitrogen)
Amortiguador de Muestra NuPAGE LDS (4x) (NP0007, Invitrogen)
45 Agente reductor de muestras NuPAGE (10x) (NP0009, Invitrogen)
Estándar sin teñir Mark12 (LC5677, Invitrogen)
50 Kit de tinción de azul Coloidal (LC6025, Invitrogen)
Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (AnalaR, BDH) Agua purificada
Agua purificada

55 **Reducción de SDS-PAGE**

Las muestras post-IEX se procesaron en geles Bis-Tris al 4-12% utilizando un amortiguador de ejecución MES a 1 µg/carril de carga. Las muestras se prepararon agregando 20 µl de material diluido post-IEX a 8 µl de amortiguador de muestra (4x), 3 µl de Agente Reductor (10x) y 3,4 µl de EDTA 0,1M. Se cargaron 15 µl de cada muestra en el pocillo directamente después de la mezcla (es decir, sin tratamiento térmico) y se ejecutaron a 200 V durante 40 minutos. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con el reactivo de la tinción de Azul Coloidal según las instrucciones del fabricante, pero con una duración de tinción fija para reducir la variación de la tinción (fijación de 10 minutos, 5 horas de tinción, 15-20 horas con agua purificada).

65 **Escaneo de gel y densitometría**

Los geles se colocaron entre 2 hojas de acetato para asegurar la eliminación de todas las burbujas de aire, se escanearon en un escáner de lecho plano a una resolución de 600 ppp y la imagen se recortó, se cambió el tamaño y se corrigió el color con el software HP Image zone. La imagen se convirtió en una imagen TIFF en escala de grises de 8 bits con el software Alpha EaseFC y las bandas de proteínas se analizaron utilizando el software de documentación en gel QuantityOne (BioRad). Después de la sustitución de fondo, las áreas de pico de intensidad de las bandas seleccionadas se convirtieron a valores de porcentaje relativo de producto (AUXI o AUXII) e impurezas en cada carril.

Estabilidad del amortiguador

Equipo:

- Bomba Peristáltica (Watson Marlow)
- 125 ml de biotainers PETG (Cellon)
- Tubos Watson Marlow para bomba peristáltica
- Medidor de pH y conductividad 4330 (Jenway)
- Cápsula de filtro Sartopore 2 300 (0,45/0,2 µm) (Sartorius)

Los amortiguadores para la ejecución de demostración de 20 l se filtraron después de la preparación a través de una cápsula de filtro de 0,45/0,2 µm en bolsas Stedim de 10 o 20 l para su almacenamiento a 2-8 °C antes de su uso.

Cuando se había filtrado la mayor parte del amortiguador, se recogieron aproximadamente 75 ml del amortiguador restante en biorrecipientes PETG de 125 ml previamente etiquetados y se almacenaron a 2-8 °C. Se registraron el pH, la conductividad, la temperatura y la fecha de preparación del amortiguador. Al finalizar la ejecución de demostración de 20 l, las muestras de amortiguador se recuperaron del almacenamiento en frío y se volvió a analizar el pH, la conductividad y la apariencia. También se registró la temperatura del amortiguador en el momento de la prueba.

Preparación de muestras para análisis de secuenciación N-terminal

Equipo:

- Fuente de alimentación de electroforesis EPS 601, (Amersham Pharmacia Biotech)
- Sistema de electroforesis Xcell SureLock Mini-Cell, (Invitrogen)
- Plataforma vibratoria de roca (Suministros de laboratorio científico)

Productos químicos:

- Geles de Tris-Glicina al 8% de Novex, 1,5 mm, 10 pocillos, (Invitrogen)
- Marcador de Alto Peso Molecular, (BioRad)
- Agente reductor de muestras NuPAGE (10x), (Invitrogen)
- Amortiguador de ejecución de SDS Tris-Glicina de Novex (10x) (Invitrogen)
- Amortiguador de muestra de SDS Tris-Glicina de Novex (2x) (Invitrogen)
- Kit de tinción con azul coloidal (Invitrogen)
- Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (AnalaR, BDH) Agua purificada
- Metanol, AnalaR (BDH)
- Ácido acético, AnalaR (BDH)
- Agua para inyección (API)
- Agua purificada

Las muestras para la secuenciación N-terminal se prepararon y se separaron en geles de Tris-glicina al 8% como se describe anteriormente. Las muestras identificadas como enriquecidas para el contaminante de 40 kDa (fracción 2 del pico de AUXII post IEX, CTL2006 # 0610H;) y el contaminante de 55 kDa (fracción 16 del pico de AUXI post IEX, CTL2006 # 0611H) se cargaron cada una en 5 carriles del gel para proporcionar material suficiente para la secuenciación (figura 89). Las fracciones post IEX de una fermentación previa de 20 l (20 l de PP3), que se enriquecieron para los contaminantes de 90 kDa asociados con ambos AUXI (fracción B7 R2, CTL2006 # 0581P) y AUXII (fracción D1, CTL2006 # 0582P) también se cargaron en varios carriles (figura 90). Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con reactivo de tinción azul coloidal según las instrucciones del fabricante y las bandas de contaminantes se cortaron y enviaron a Alta Bioscience (Universidad de Birmingham, Reino Unido) para la secuenciación N-terminal. El contaminante asociado con AUXI de 90 kDa (CTL2006 # 0612H) de la ejecución de demostración de 20 l también se envió para secuenciación pero no se obtuvieron datos.

RESUMEN DE LA FABRICACIÓN DEL PROCESO 3

Fermentación

El proceso de fermentación alimentada discontinua con Fitona (Proceso 2) para la producción de colagenasa a partir de *Clostridium histolyticum* ha demostrado ser altamente variable debido a la variabilidad de lote a lote en la Fitona peptona. Por este motivo, se evaluó la proteosa peptona # 3 (PP3) en fermentaciones de 5 l. La evaluación demostró que cuando se usaba un lote específico de PP3 a 50 g/l, el proceso de fermentación era consistente y reproducible. Sin embargo, cuando se emplearon otros lotes de PP3 a 50 g/l, se observaron grandes variaciones en los perfiles de crecimiento de los cultivos. La concentración máxima de biomasa que apoyarían los diversos lotes de PP3 se evaluó en una evaluación a pequeña escala. Estos lotes se consideraron "buenos" o "malos" en función de su capacidad para soportar concentraciones altas o bajas de biomasa de *C. histolyticum* respectivamente. Cuando se realizaron dos fermentaciones a escala de 5 l con lotes "malos" y "buenos" de PP3 a 100 g/l, ambos demostraron perfiles de crecimiento y rendimientos de producto altamente similares. Este experimento mostró que aumentar la concentración de PP3 a 100 g/l aliviaba el problema asociado a la variación de lote a lote en la peptona.

Se llevó a cabo una ampliación de la escala de fermentación a 200 l. La fermentación utilizó la concentración optimizada de PP3 (100 g/l). La fermentación fue exitosa y replicó tanto el perfil de crecimiento como el rendimiento/calidad del producto observados a escala de 5 l. El proceso de cosecha (aclorado por filtración) desarrollado para el Proceso 2 se evaluó durante la fermentación aumentada a 200 l. El cultivo celular se aclaró con éxito utilizando el proceso existente sin bloqueo del tren de filtración.

La cuantificación de la concentración de colagenasa en muestras de fermentación brutas se mejoró mediante el análisis de densitometría de los geles de Tris Glicina teñidos con Coomassie. Se cargó una curva patrón de mezcla de AUXI y AUXII con diluciones de muestras de fermentación. La relación entre la concentración de colagenasa y el área del pico de densitometría se mostró lineal dentro del intervalo de las diluciones de la muestra. Las concentraciones de colagenasa en las muestras se extrapolaron a continuación utilizando su área de pico y la curva patrón. Este método estimó que el rendimiento de colagenasa era de 280 a 350 mg/l a partir del proceso con PP3 de 100 g/l a escala de 5 y 200 l.

El proceso optimizado de fermentación con PP3 generó una mayor concentración de biomasa (DO600 7 unidades) y un mayor rendimiento del producto (280 - 350 mg/l de colagenasa total, por densitometría cuantitativa) en comparación con el proceso de alimentación discontinua con Fitona. El filtrado de fermentación contenía significativamente menos clostripaína que el proceso con Fitona. La relación AUXI:AUXII fue más cercana a 1 en comparación con la observada durante la evaluación del Proceso 2. En resumen, el proceso con PP3 aumentó el rendimiento del producto, la pureza (post-fermentación) y la reproducibilidad de la fermentación.

Purificación

El proceso 3 se desarrolló en un marco de tiempo acelerado para mejorar los procesos desarrollados previamente en Cobra (Proceso 2) y ejecutarse a una escala de 20 l en GMP. Se realizaron mejoras importantes en el proceso para simplificar el proceso de purificación, facilitar la consistencia y hacer que el proceso sea más fácil de escalar hasta 200 l. Estas mejoras también se consideraron claves para ayudar a la validación del proceso.

El proceso 3 se realizó utilizando material de una fermentación de 200 litros de *Clostridium histolyticum* en el que se purificaron 20 l completos de fermentación. El material se procesó directamente a partir de la fermentación y no se implementaron etapas de espera. Después de la filtración, el producto se pasó a través de un filtro Mustang Q, ya que los experimentos a pequeña escala demostraron la reducción de ADNdc (según lo detectado por el análisis de pico verde) utilizando este procedimiento. Sin embargo, el análisis de las muestras en proceso de la ejecución de demostración de 20 l, no mostró una reducción en el ADNdc, lo que sugirió que la consistencia y la aplicación de esta etapa requieren una investigación adicional. Una comparación de los parámetros utilizados para la ejecución de 20 L y los experimentos previos a pequeña escala demostraron la eliminación del ADNdc cuando la

cápsula estaba sobredimensionada por un factor de 1000 (basado en las capacidades de unión al ADN de 15-25 mg de cápsula de ADN/ml descrita por el fabricante). En comparación, la cápsula utilizada en la ejecución de 20 l se sobredimensionó en un factor de aproximadamente 177-296. El material de la cápsula Mustang Q se mantuvo durante la noche a 2-8 °C. Un estudio de estabilidad fuera de línea en material de muestra tomado en esta etapa del proceso indicó que mantener una temperatura baja era clave para la estabilidad del producto en este punto del proceso, ya que las muestras incubadas a temperatura ambiente y 37 °C eran susceptibles de degradación, según lo indicado por el análisis de SDS-PAGE.

El producto de la cápsula Mustang Q se preparó para la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) mediante la adición y mezcla de una solución de sulfato de amonio (3M) para lograr una concentración final de 1M. Esto proporcionó las condiciones adecuadas para la unión de colagenasa a medios de Fenil Sepharose FF (sub bajo). A continuación, se eluyó una relación de proteínas contaminantes y pigmento de la columna HIC usando una elución escalonada de sulfato de amonio 0,3 M seguida de la elución del producto de colagenasa con una solución que no contenía sulfato de amonio. Los criterios para la recolección del pico de producto se establecieron como un volumen fijo de 4 volúmenes de columna (aunque esto se extendió posteriormente a 5 volúmenes de columna para la ejecución de demostración de escala 200 l). A continuación, se añadió leupeptina inmediatamente después de la elución y el material se mantuvo durante un período de 2 días a 2-8 °C. El rendimiento de esta etapa fue difícil de determinar con precisión debido a la naturaleza compleja de la materia prima. El rendimiento de la etapa del proceso se estimó en (i) 38% basándose en el ensayo de Bradford de la carga y UV del material eluido o (ii) 47% basándose en el contenido de colagenasa en la carga estimada por densitometría y UV del material eluido. Como alternativa, se eluyeron 0,17 g de proteína total de la columna HIC por el equivalente de cada 1 l de filtrado de fermentación aplicado.

La agrupación post HIC se preparó para la purificación con Q-Sepharose por concentración (5 veces) e intercambio de amortiguador usando filtración de flujo tangencial (TFF1) utilizando 2 x membranas de 0,1m² de 30 kDa. No se detectó ninguna pérdida en esta etapa y el aumento reportado en la proteína recuperada puede reflejar la inexactitud de UV en este punto del proceso. La inexactitud podría atribuirse a la contaminación por pigmento o al uso del coeficiente de extinción para colagenasas, que será menos preciso para el material antes en la purificación cuando es probable que esté presente un complejo de proteínas. La etapa de TFF se completó con una etapa de filtración del producto antes de mantener el material a 2-8 °C durante la noche.

Al igual que con el Proceso 2, la columna Q-Sepharose fue una etapa clave de purificación en el Proceso 3 y dio como resultado la separación de las colagenasas AUXI y AUXII. Los contaminantes asociados con el proceso 3, sin embargo, eran diferentes a los del proceso 2 y parecían copurificarse estrechamente con los productos AUXI y AUXII. Sin embargo, fue posible eliminar los contaminantes de los productos mediante el fraccionamiento de los picos del producto, ya que los contaminantes parecían eluir en los bordes delanteros o en la cola de ambos picos. Los contaminantes se indicaron por su masa molecular relativa en la SDS-PAGE reductora. Aquellos asociados con el producto AUXII (el primer pico eluido de la columna Q-Sepharose) se identificaron como (i) 40kDa (asociado con el borde anterior del pico) y (ii) 75kDa y 90kDa (asociado con el borde posterior del pico). La secuenciación de aminoácidos N-terminal indicó que el 40 kDa estaba relacionado con AUXII ya que la secuencia coincidía con una región de la secuencia Col H. En comparación, no se pudo confirmar la identidad del contaminante de 90 kDa debido a problemas de baja señal. Los contaminantes asociados con el producto AUXI (el segundo pico eluido de la columna Q-Sepharose) fueron (i) 55 kDa (asociado con el borde anterior del pico) y (ii) 90 kDa (asociado con el borde posterior del pico). La secuenciación N-terminal mostró que tanto los contaminantes de 55 kDa como los de 90 kDa se identificaban como relacionados con AUXI, donde el contaminante de 55kDa mostró una identidad de secuencia con una región media en la secuencia de Col G y el de 90kDa mostró una coincidencia N-terminal idéntica a AUXI. Como consecuencia, las principales impurezas identificadas en esta etapa del proceso estaban relacionadas con el producto y se identificaron como productos de escisión interna de AUXI (55kDa) y AUXII (40kDa) o un producto de AUXI (90kDa) escindido en el extremo C-terminal.

Después de la columna de Q-Sepharose, una etapa clave del proceso fue la decisión de qué fracciones deberían avanzar para una purificación adicional. Para la ejecución de demostración de 20 l, este criterio se basó en las intensidades de tinción relativas de los contaminantes en el producto cuando se analizó con SDS-PAGE al 4-12% y se tiñó con tinción Azul Coloidal. La decisión fue subjetiva y se basó en la experiencia colectiva del grupo de desarrollo de procesos, así como en las solicitudes del cliente. Para establecer los criterios definidos que describieron el procedimiento de agrupación, se realizó densitometría en SD-SPAGE. A partir de esto, se describió que el agrupamiento incluía fracciones que eran ≥87% puras (sin impureza única ≥10%) para AUXI y ≥94% puras (sin impureza única ≥4%) para AUXII. Esto dio lugar a un rendimiento por etapas basado en la estimación de UV del 27,7% y 25,8% para AUXI y AUXII respectivamente. Se logró un refinamiento y normalización adicionales del método de densitometría a partir de los datos adquiridos a partir de la ejecución de demostración a escala de 200 l que dio como resultado la definición de criterios modificados para la posterior ejecución de GMP.

Las fracciones que contenían el producto AUXI o AUXII de la columna Q-Sepharose se formularon por separado mediante TFF (denominada TFF2) utilizando 1 x 0,1m² de membrana de 30 kDa para cada colagenasa. El amortiguador de formulación de Tris 10 mM, sacarosa 60 mM, pH 8, fue establecido por KBI BioPharma Inc. El producto se filtró después de la etapa TFF2 y los rendimientos de la etapa total para TFF y la filtración se estimaron

en 97,5% para AUXI y 92,2% para AUXII. En esta etapa, las muestras se denominaron intermedios y se conservaron a 2-8°C para el análisis de control de calidad y antes de mezclar la sustancia farmacéutica. Un estudio de estabilidad retrospectivo indicó que los intermedios eran estables durante un período de al menos 5 días a 2-8 °C según lo determinado por análisis de SDS-PAGE, UV, RP-HPLC y SEC-HPLC. El único deterioro detectado en los intermedios se identificó en el intermedio AUXII después de una espera de 12 días en el que los niveles de agregados aumentaron de 0 a 0,62%.

Los intermedios AUXI y AUXII se mezclaron en una relación igual (determinada por UV) para generar la sustancia farmacéutica antes de realizar una filtración del producto final. Solo se prepararon 400 mg de sustancia farmacéutica, de los cuales 200 mg se enviaron a KBI BioPharma Inc. junto con 25 mg de cada intermedio. El rendimiento general del proceso se estimó para la ejecución de demostración de 20 litros en la que se procesó todo el material disponible de los 20 litros de materia prima de fermentación y suponiendo que todo el material se había mezclado como sustancia farmacéutica. Esto dio un rendimiento previsto de 1,6 g de sustancia farmacéutica para la purificación a escala de 20 l. Esto equivale a una recuperación del proceso del 17,8% basándose en la suposición de que la estimación inicial de 9 g (usando el ensayo Bradford) para la cantidad de proteína total disponible para cargar en la columna HIC fue precisa. Como alternativa, si la proteína total disponible estaba relacionada con el contenido de colagenasa en la carga de HIC (según lo estimado por densitometría), el rendimiento global del proceso se calculó como 22%.

Además de la ejecución del proceso, se realizaron algunos estudios preliminares en la muestra y las reservas de amortiguador se tomaron del proceso para evaluar la estabilidad. Estos datos indicaron que para el producto, la baja temperatura era un factor clave para controlar la degradación y las muestras tomadas temprano en la purificación (antes de la columna de Q-Sepharose) eran más susceptibles a la proteólisis. Sin embargo, un estudio de retención de productos demostró, que la combinación de leupeptina y control de temperatura (2-8 °C) era exitosa para mantener la calidad del producto en los cursos de tiempo previstos para el proceso de GMP.

Las Tablas 54 y 55 detallan las especificaciones analíticas de los productos intermedios AUX-I y AUX-II y también para el fármaco para el Proceso 3.

Tabla 54: Especificaciones analíticas para los intermedios AUX-I y AUX-II del Proceso 3

Ensayo	Especificación	
	AUX-I	AUX-II
Aspecto	Claro incoloro y libre de materia particulada	Claro incoloro y libre de materia particulada
*Endotoxina	≤10 UE/ml	≤10 UE/ml
Identidad (y pureza) por SDS-PAGE (condiciones reducidas, tinción de Coomassie y con plata)	Banda de principal entre 98 - 188 kDa, y sin bandas menores	Banda de principal entre 98 - 188 kDa, y sin bandas menores
* Proteína total por Espectroscopia de Absorbancia	0,8 - 1,2 mg/ml	0,8 - 1,2 mg/ml
Ensayo de SRC (AUX-I)	12 000 - 21 000 unidades de fSRC/mg	No aplicable
Ensayo de GPA (AUX-II)	No aplicable	370 000 - 680 000 unidades de fGPA/mg
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	≥ 98 % pico principal	≥ 98 % pico principal
* Análisis de proteínas mediante el sistema HPLC Agilent 1100 (pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	≥ 97 % por área	≥ 97 % por área
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (Pureza por cromatografía de líquidos de fase inversa)	≤ 1 % por área	≤ 1 % por área
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (clostripaína residual por cromatografía de líquidos de fase inversa)	≤ 1 % por área	≤ 1 % por área
Identidad por Mapeo de Péptidos	Se ajusta a la referencia	Se ajusta a la referencia
Carga biológica	≤100 UFC/ml	≤100 UFC/ml
*Pruebas requeridas para la liberación provisional de productos intermedios para fabricación adicional		

Tabla 55: Especificaciones analíticas para el Fármaco del Proceso 3

Ensayo	Especificación	
	AUX-I	AUX-II
Aspecto	Claro incoloro y esencialmente libre de partículas	
Medida potenciométrica del pH de la Solución	7,5 a 8,5	
Endotoxina	< 10 UE/ml	
Identidad (y pureza) por SDS-PAGE (condiciones reducidas, tinción de Coomasie y con plata)	Banda principal de colagenasa entre marcadores de MW de 98-188KDA	Banda principal de colagenasa entre 97 - 200 kDa; Marcadores de MW;
* Proteína total por espectroscopia de absorbancia	0,8 - 1,2 mg/ml	
* Ensayo SRC (AUX-I)	13 000 - 23 000 unidades de fSRC/mg	NA
* Ensayo GPA (AUX-II)	NA	200 000 - 380 000 unidades de fGPA/mg
Proteína de la célula hospedadora residual	Comparable al patrón de referencia; ninguna banda de impureza individual que muestre mayor intensidad que el marcador de intensidad BSA al 1%	
ADN de la célula hospedadora residual	≤ 10 pg/dosis	
Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (agregación por cromatografía de exclusión por tamaño)	≥ 98 % del pico principal; ≤ 2 % de agregados por área	
* Análisis de proteínas usando el sistema Agilent 1100 HPLC (identidad y pureza mediante cromatografía de líquidos de fase inversa)	2 picos principales (AUX I y AUX II), combinados ≥ 97% por área; Tiempos de retención de AUX-I y AUX-II dentro del 5% de referencia	
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (clostripaína residual por cromatografía de líquidos de fase inversa)	≤ 1 % por área	
Análisis de proteínas utilizando el sistema HPLC Agilent 1100 (Pureza por cromatografía de líquidos de fase inversa)	≤ 1 % por área	
Leupeptina residual por cromatografía de fase inversa	≤ 1 ug/mg p/p	
*Carga biológica	< 1 ufc/ml	
*Pruebas requeridas para la liberación provisional de la sustancia farmacéutica para fabricación adicional.		

5 La patente y la bibliografía científica a la que se hace referencia aquí establecen el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sustancia farmacéutica, que comprende como únicos ingredientes activos colagenasa I y colagenasa II *Clostridium histolyticum* aisladas y purificadas presentes en una relación másica de 1:1, en la que tanto la colagenasa I como la colagenasa II son al menos 95% puras en área, según se determina por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.
2. La sustancia farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la sustancia farmacéutica es un polvo liofilizado.
- 10 3. La sustancia farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la identidad y pureza de la colagenasa I cuando se ensaya por electroforesis en gel de SDS-PAGE (condiciones reducidas, teñida con Coomassie y plata) tiene una banda principal entre aproximadamente 98 y aproximadamente 188 kDa.
- 15 4. La sustancia farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en la que la identidad y pureza de la colagenasa II cuando se ensaya por electroforesis en gel de SDS-PAGE (condiciones reducidas, teñida con Coomassie y teñida con plata) tiene una banda principal entre aproximadamente 97 y aproximadamente 200 kDa.
- 20 5. La sustancia farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en la que la colagenasa I tiene una actividad específica de aproximadamente 13.000 a aproximadamente 23.000 unidades de fSRC/mg, y la colagenasa II tiene una actividad específica de aproximadamente 230.000 a aproximadamente 430.000 unidades de fGPA/mg.
- 25 6. La sustancia farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, en la que un análisis de la presencia de proteínas residuales de la célula hospedadora no muestra ninguna banda de impurezas individual que muestre mayor intensidad que un marcador de intensidad de seroalbúmina bovina (BSA) al 1%.
- 30 7. La sustancia farmacéutica de la reivindicación 1, en la que tanto la colagenasa I como la colagenasa II son al menos 97% puras por área según se determina por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.
- 35 8. La sustancia farmacéutica de cualquier reivindicación anterior, para uso en medicina.
- 40 9. Un procedimiento para producir una sustancia farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6, que comprende las etapas de:
 - a) fermentar la *Clostridium histolyticum*;
 - b) cosechar una fermentación bruta que comprende colagenasa I y colagenasa II;
 - 35 c) purificar la colagenasa I y la colagenasa II de la cosecha bruta mediante filtración y cromatografía en columna; y
 - d) combinar la colagenasa I y la colagenasa II purificadas de la etapa (c) en una relación de 1 a 1, en el que la etapa de purificación comprende las etapas de:
 - 40 i) filtrar la cosecha bruta a través de un filtro de intercambio aniónico;
 - ii) añadir sulfato de amonio;
 - iii) filtrar la cosecha bruta;
 - iv) hacer pasar la cosecha a través de una columna HIC;
 - v) añadir leupeptina al filtrado;
 - 45 vi) eliminar el sulfato de amonio y mantener la leupeptina para una correcta unión de colagenasa I y colagenasa II con intercambio de amortiguador por TFF;
 - vii) filtrar la mezcla de la etapa (vi); y
 - viii) separar la colagenasa I y la colagenasa II utilizando cromatografía de intercambio aniónico;
 - ix) preparar la concentración y formulación de TFF para colagenasa I y colagenasa II por separado; y
 - 50 x) filtrar a través de un sistema de filtración de 0,2 µm.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el rendimiento del producto es aproximadamente 280 a aproximadamente 350 mg de colagenasa total por litro.

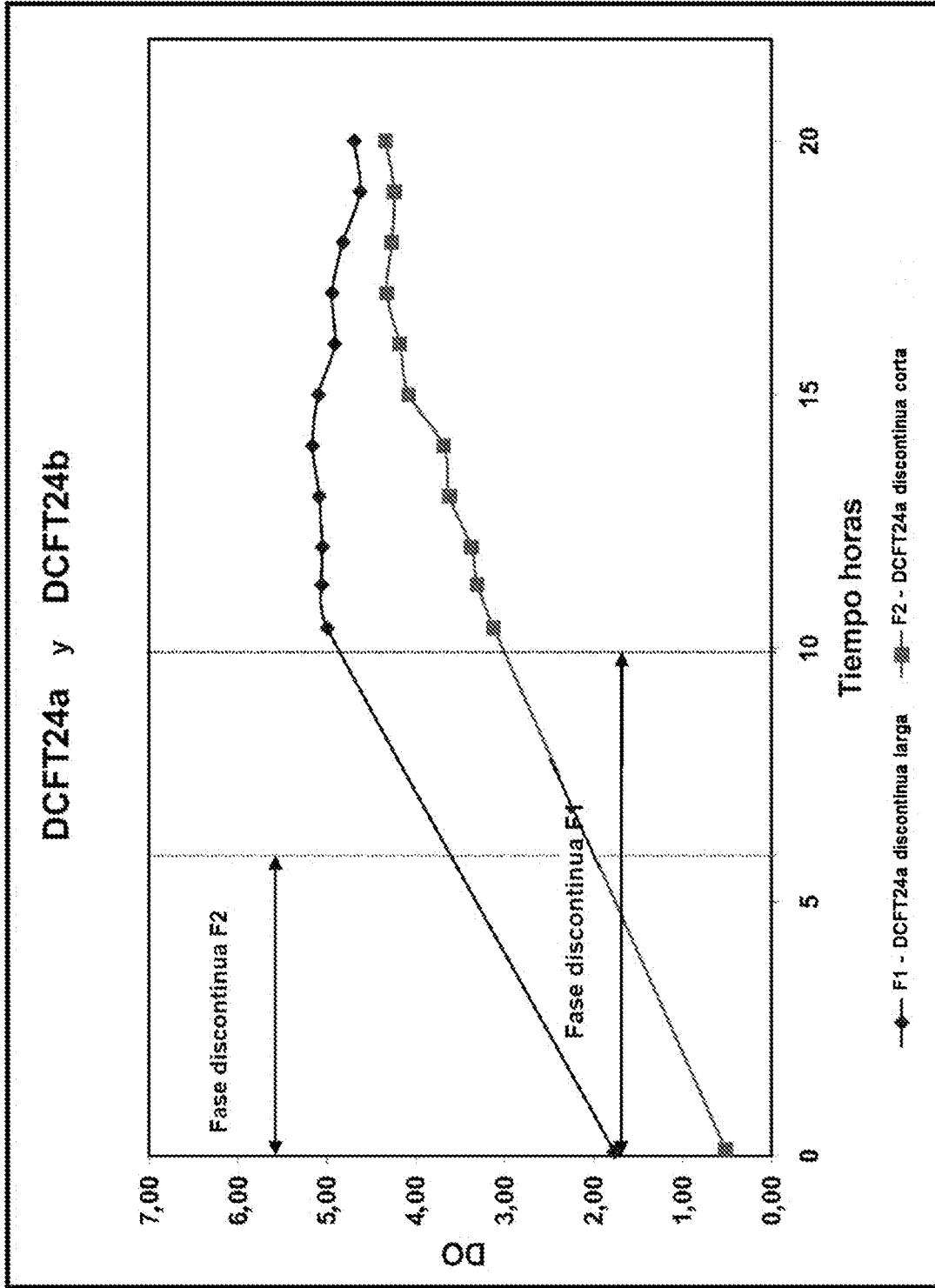


FIG. 1

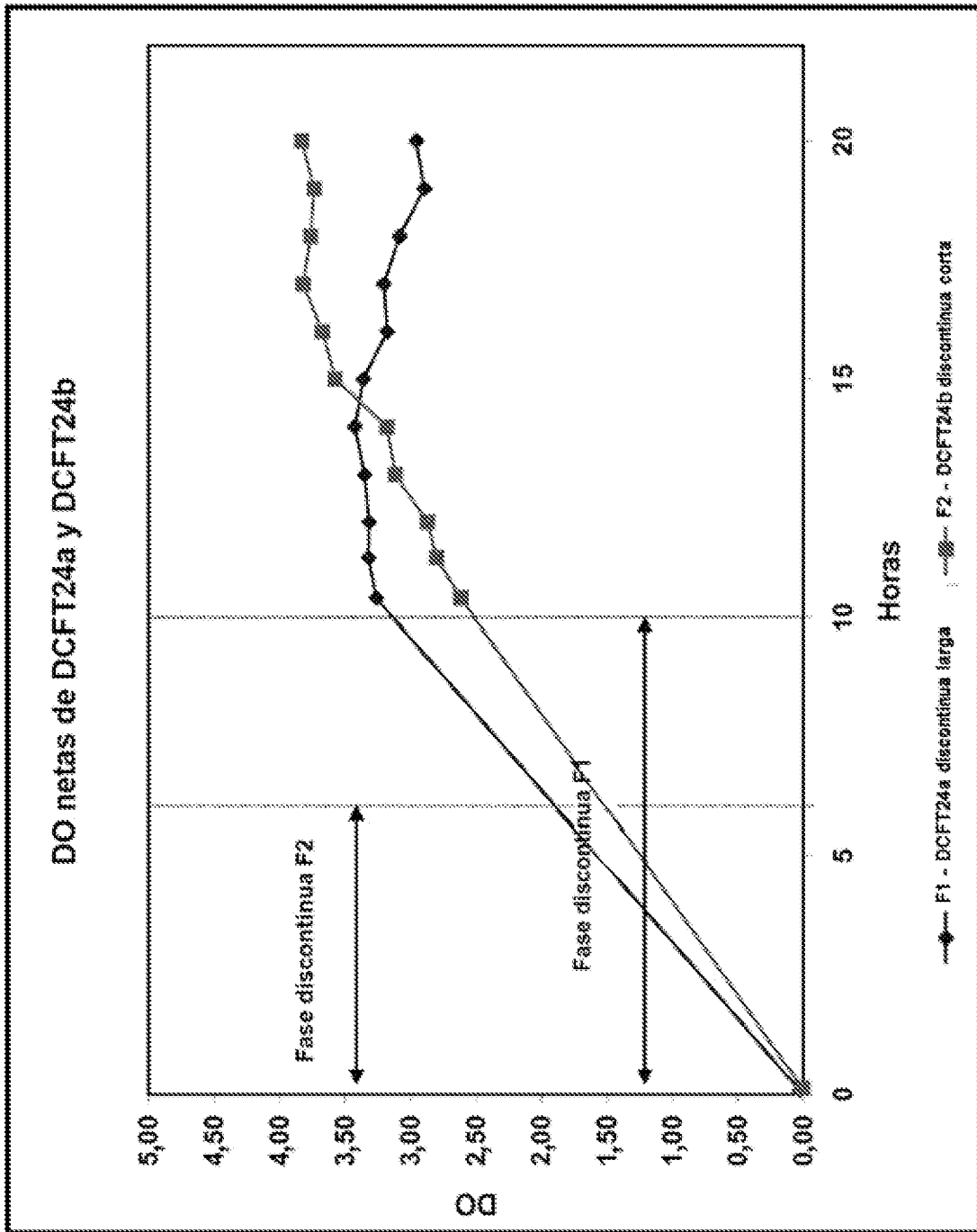


FIG. 2

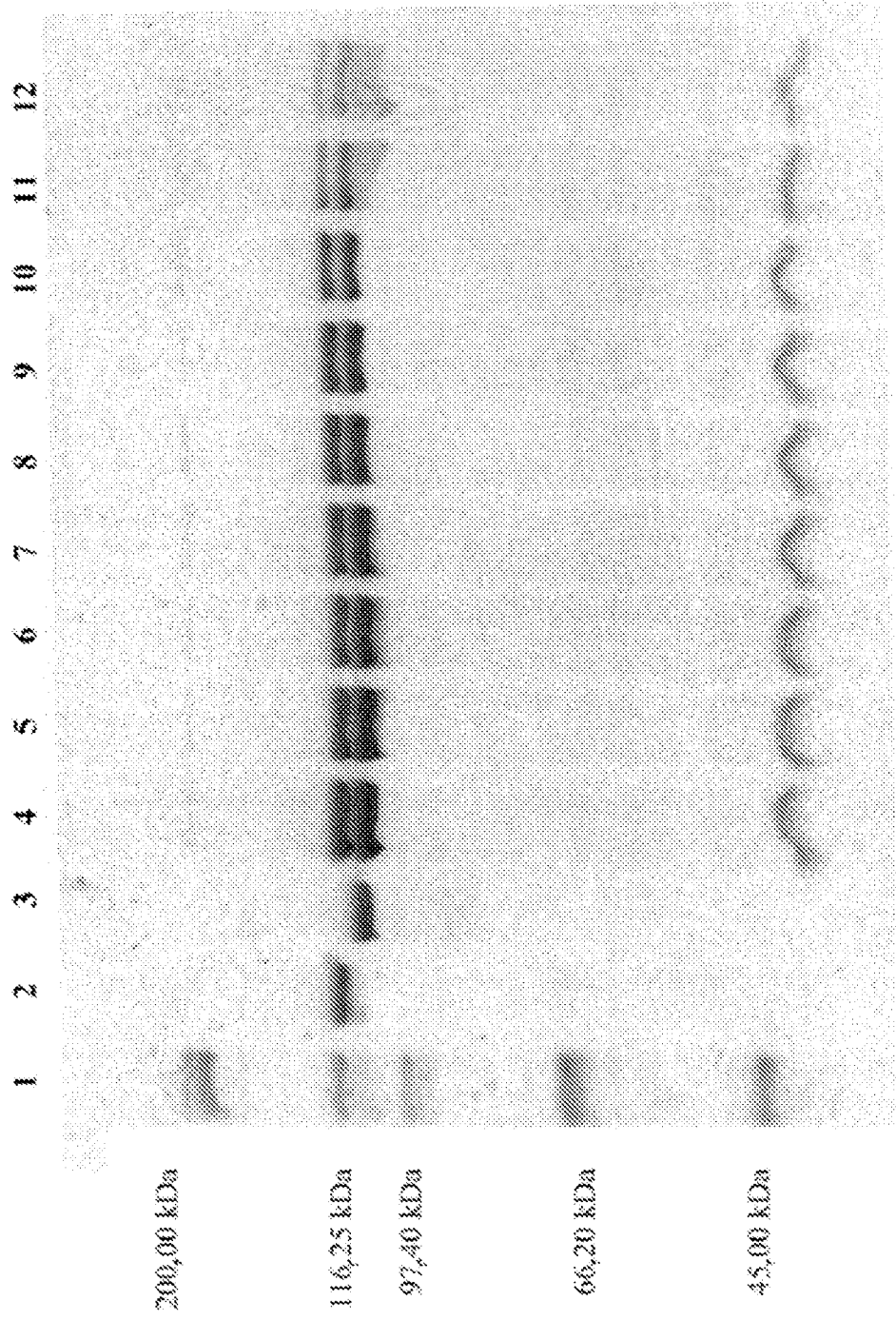


FIG. 3

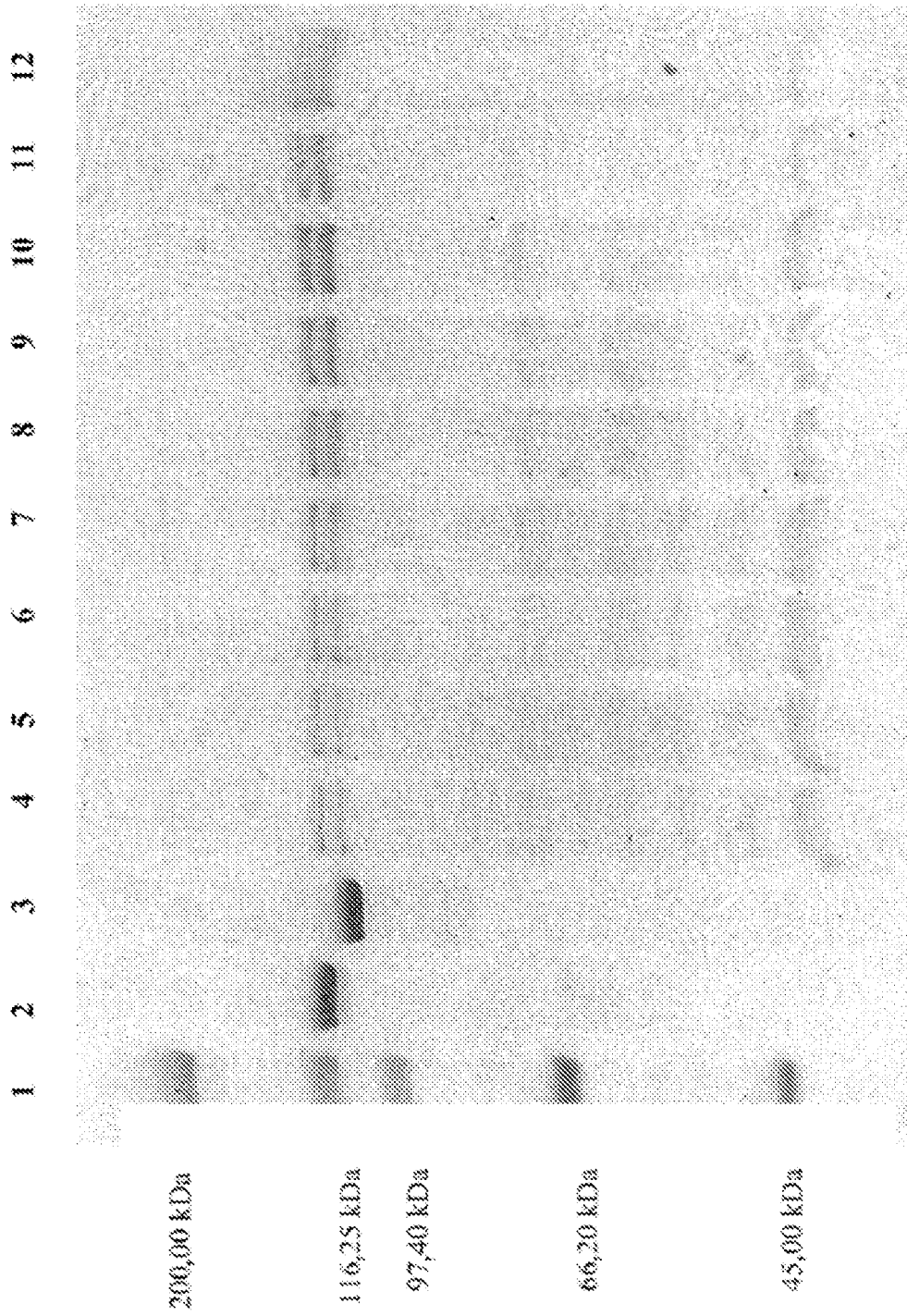


FIG. 4

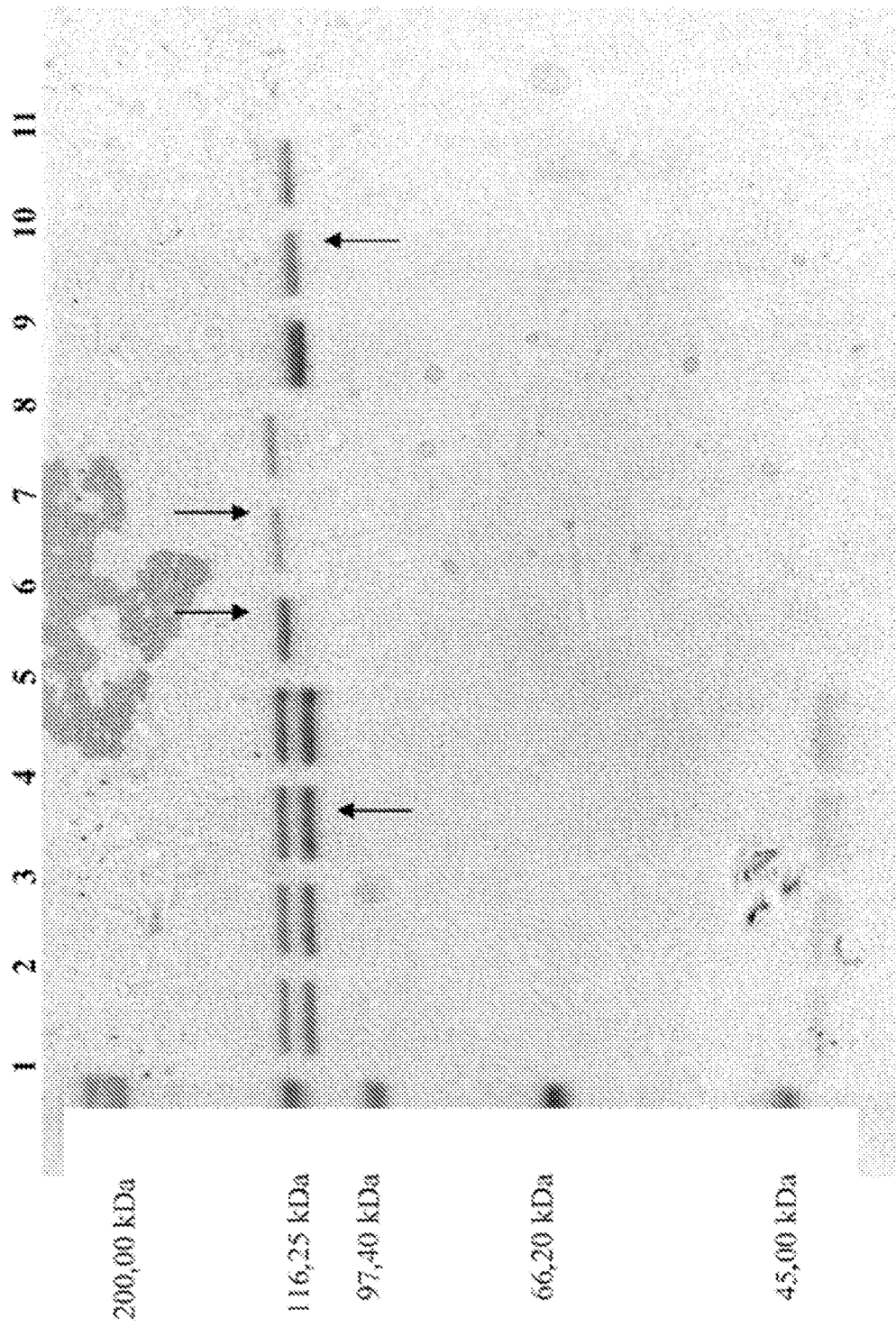


FIG. 5

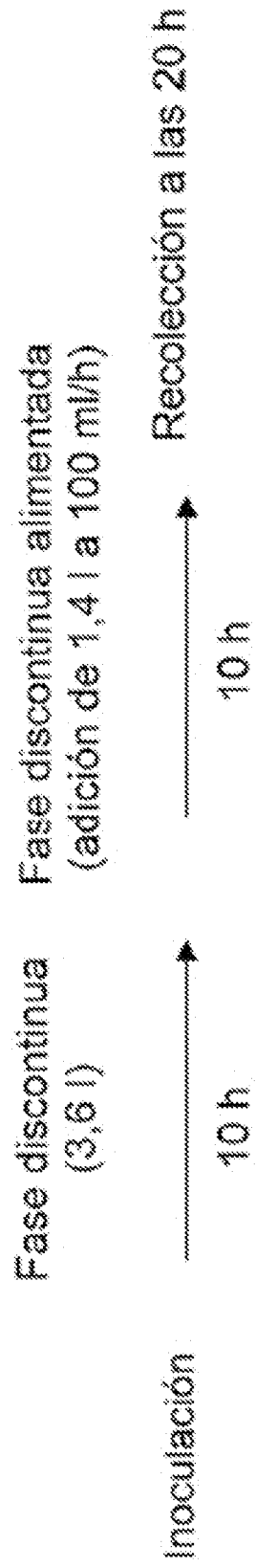


FIG. 6

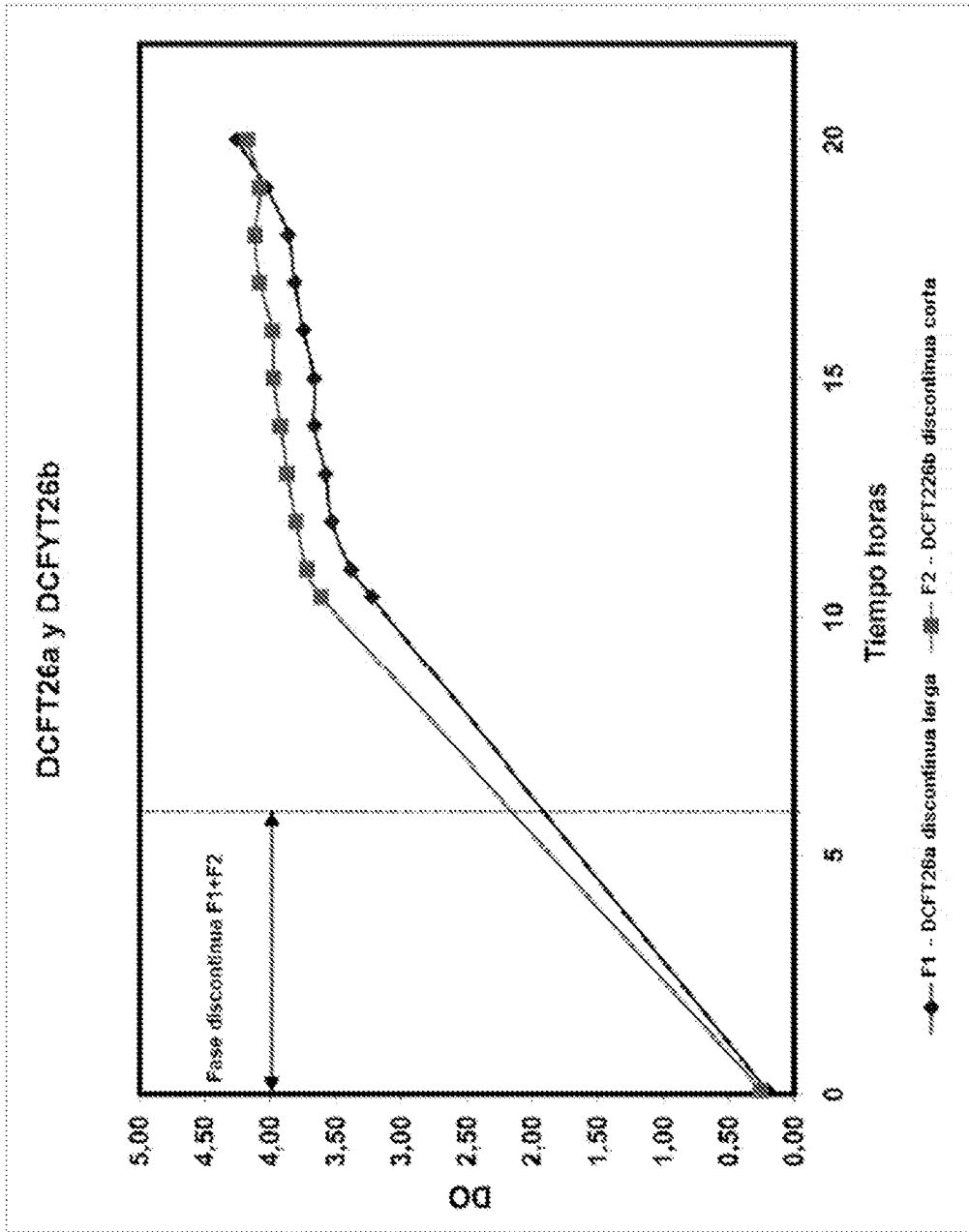


FIG. 7

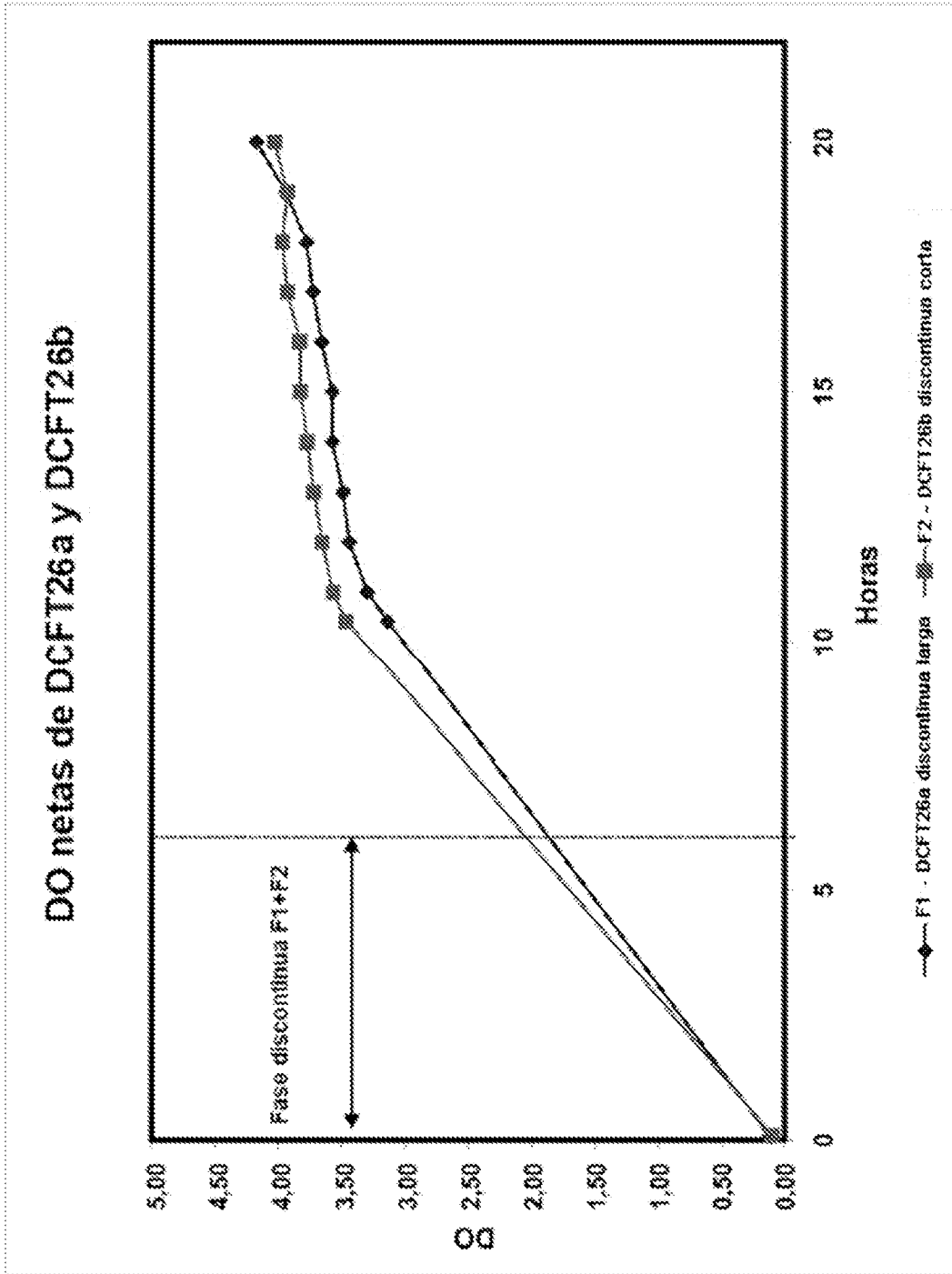


FIG. 8

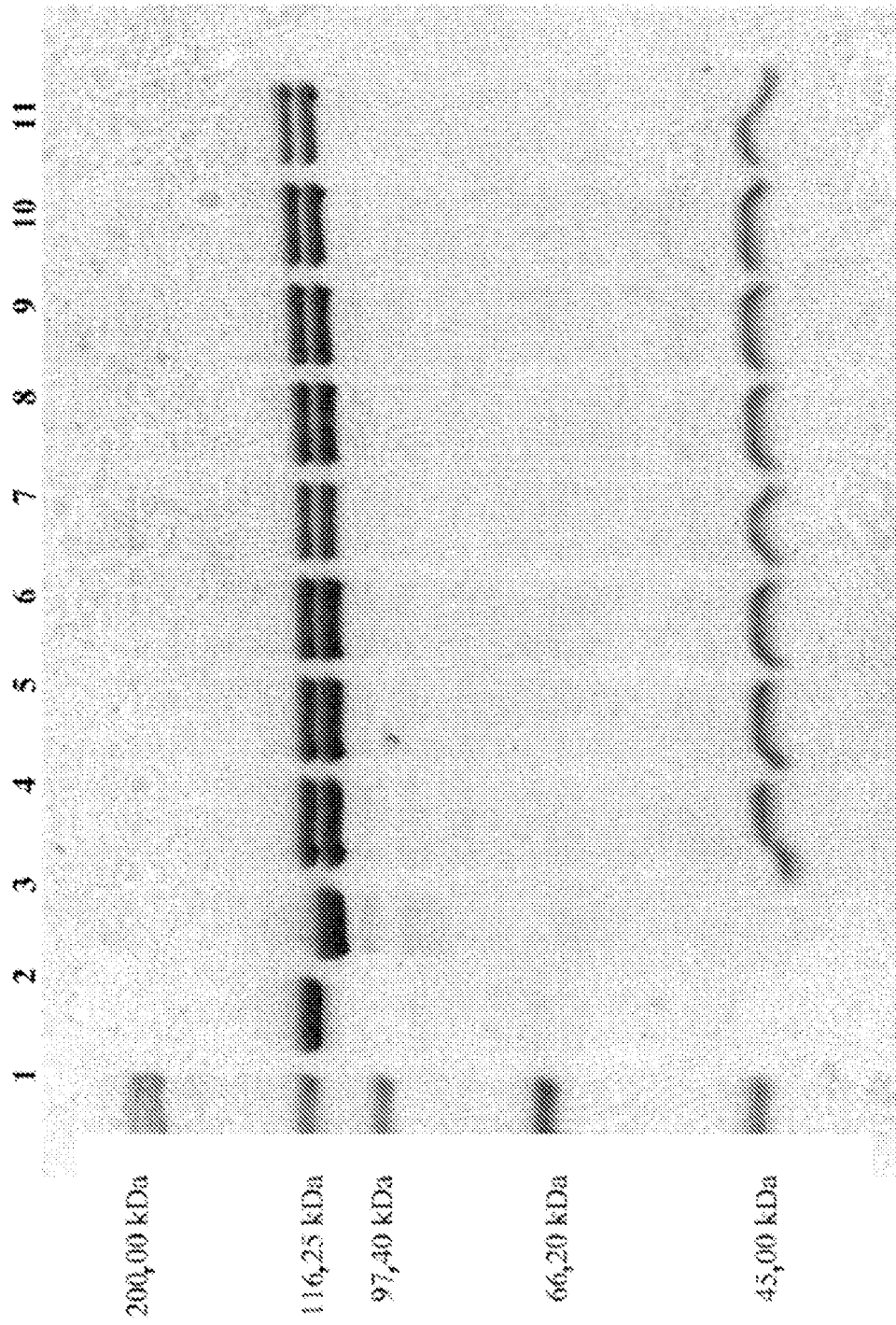


FIG. 9

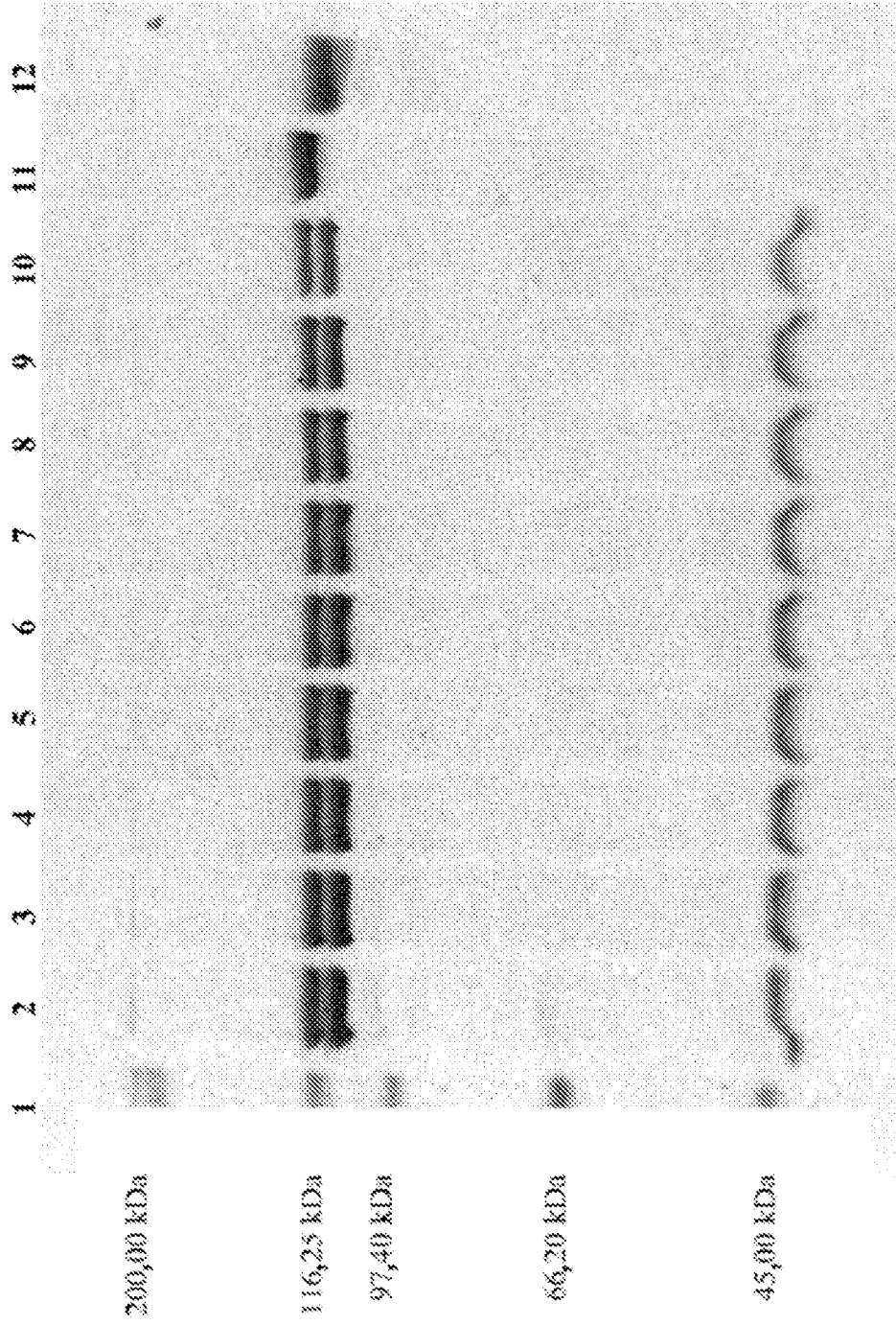


FIG. 10

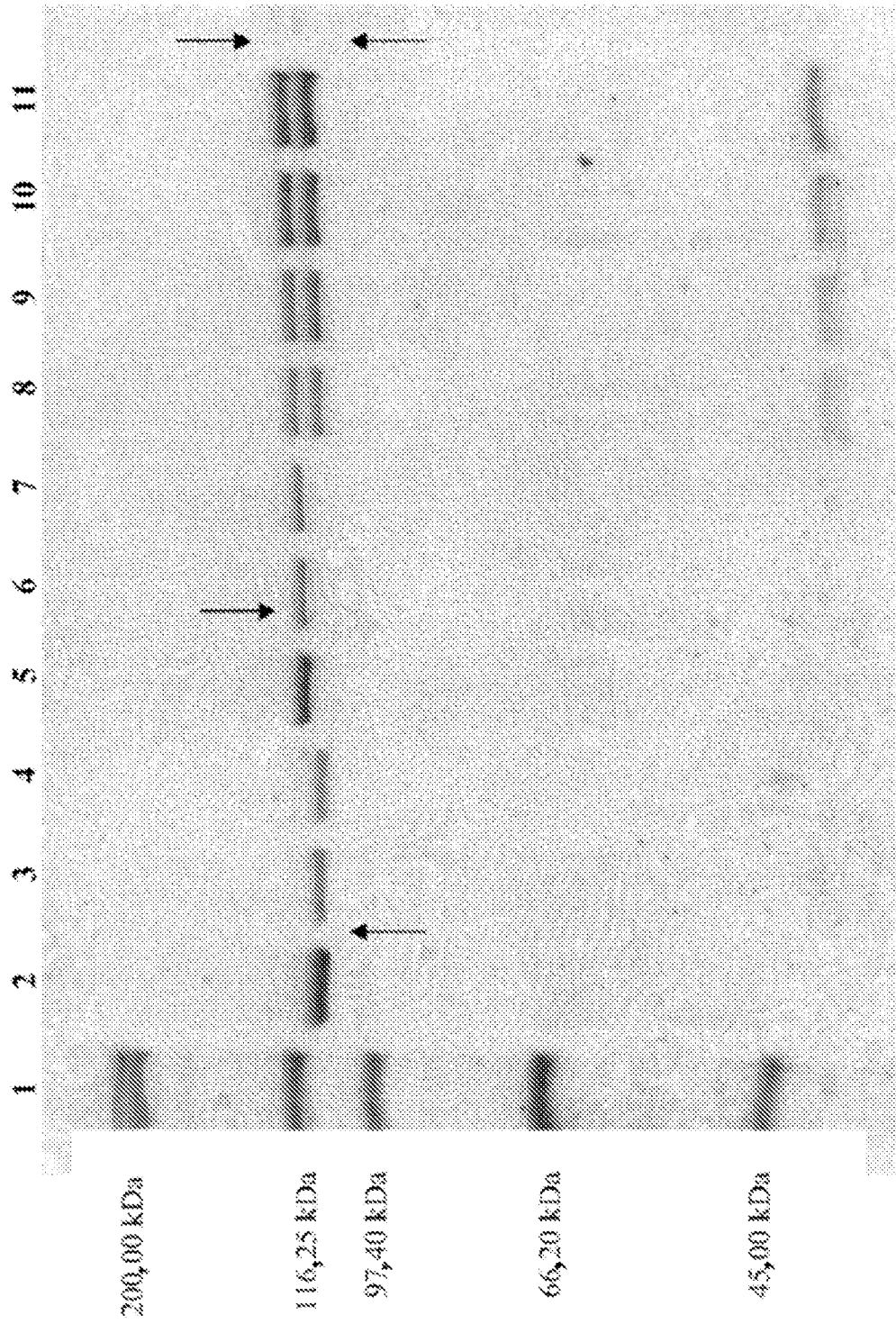


FIG. 11

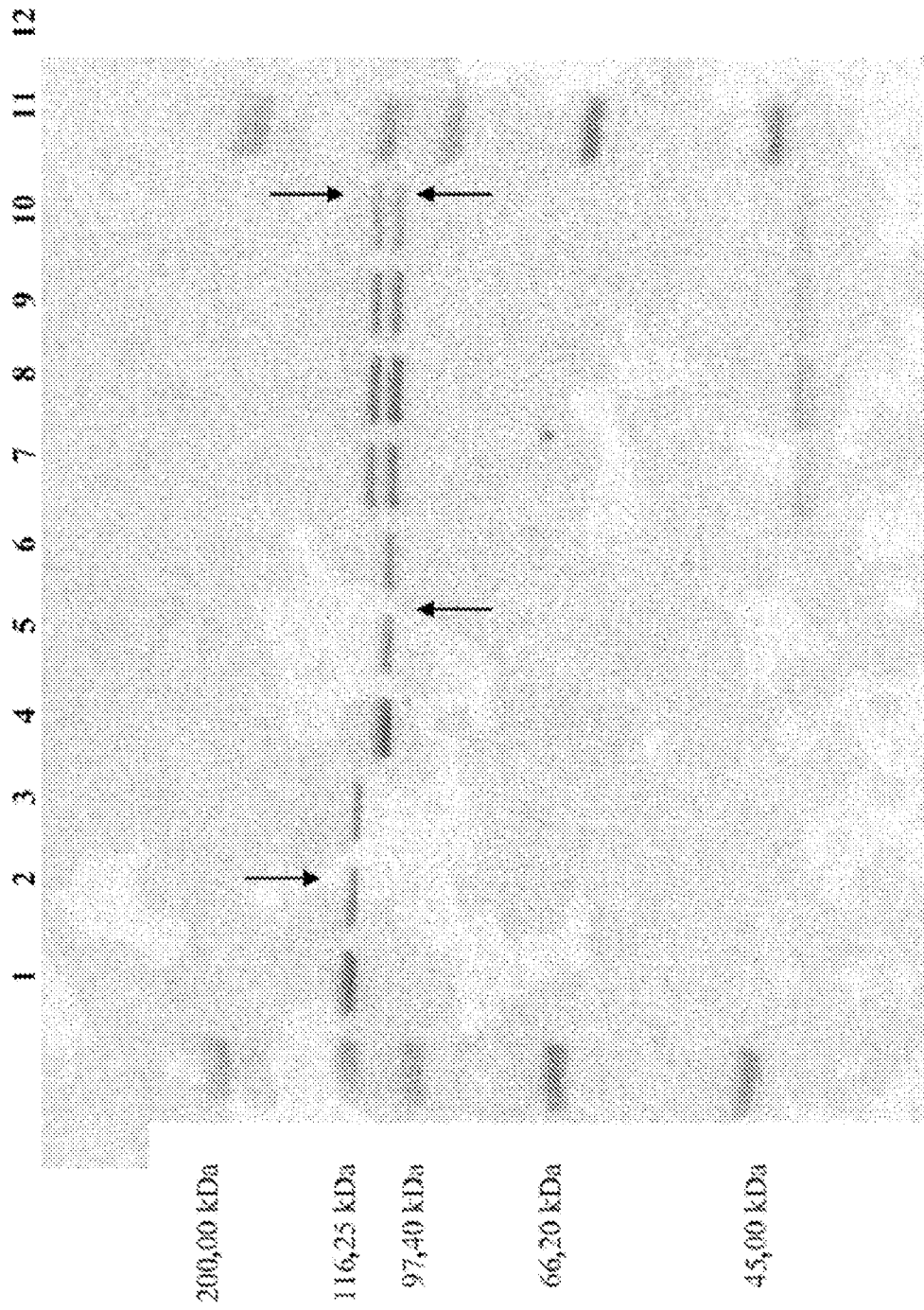


FIG. 12

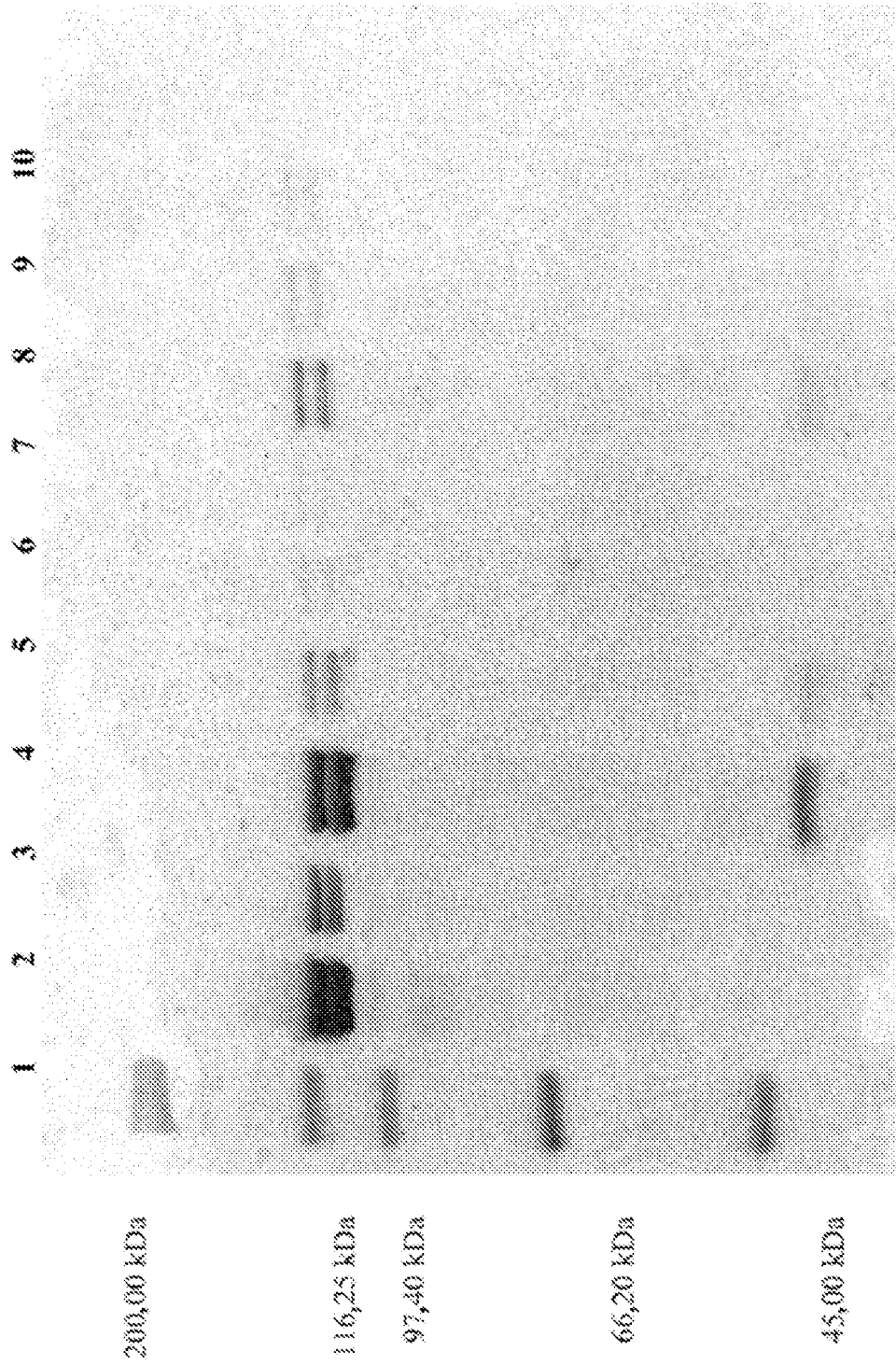


FIG. 13

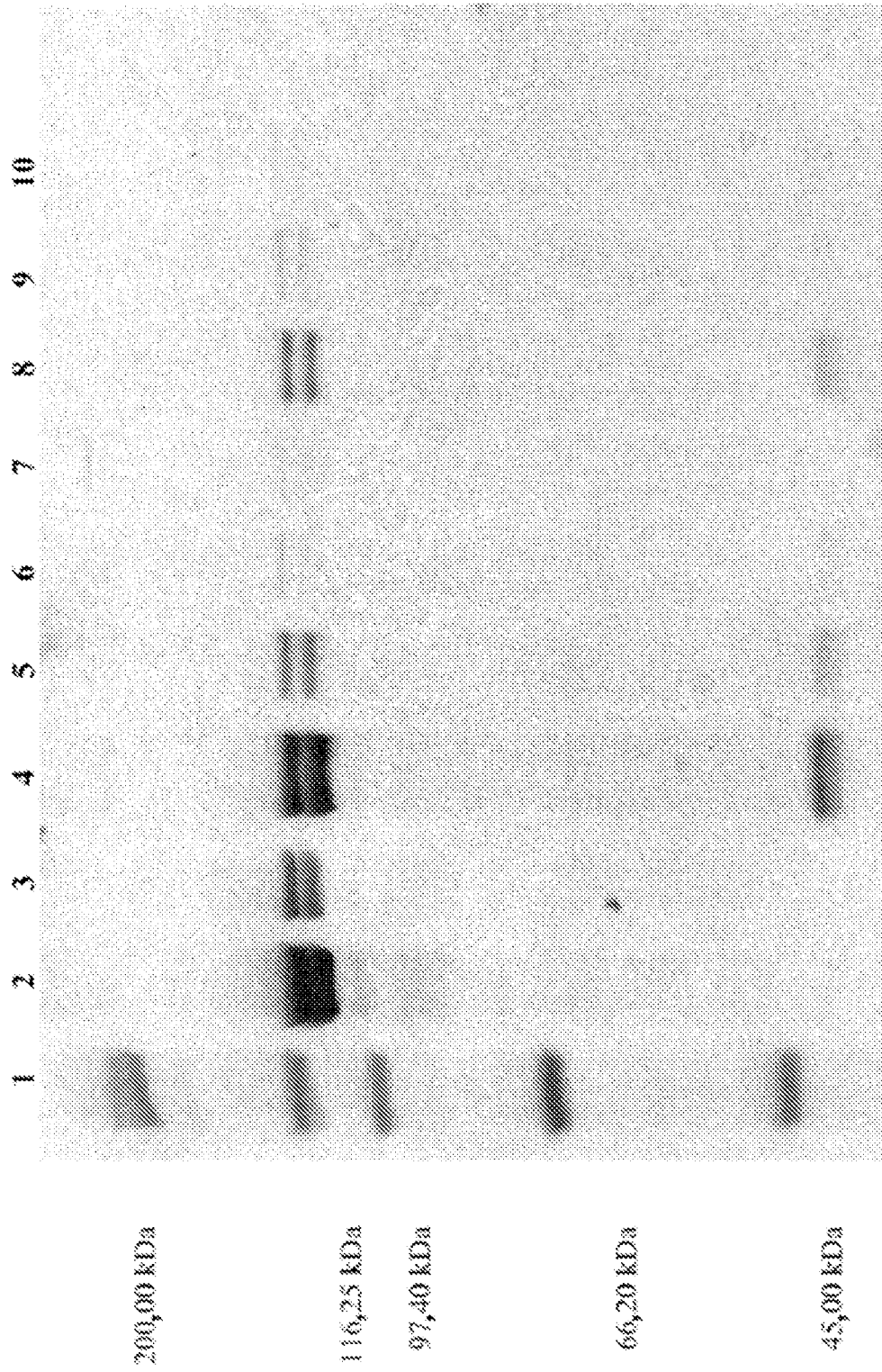


FIG. 14

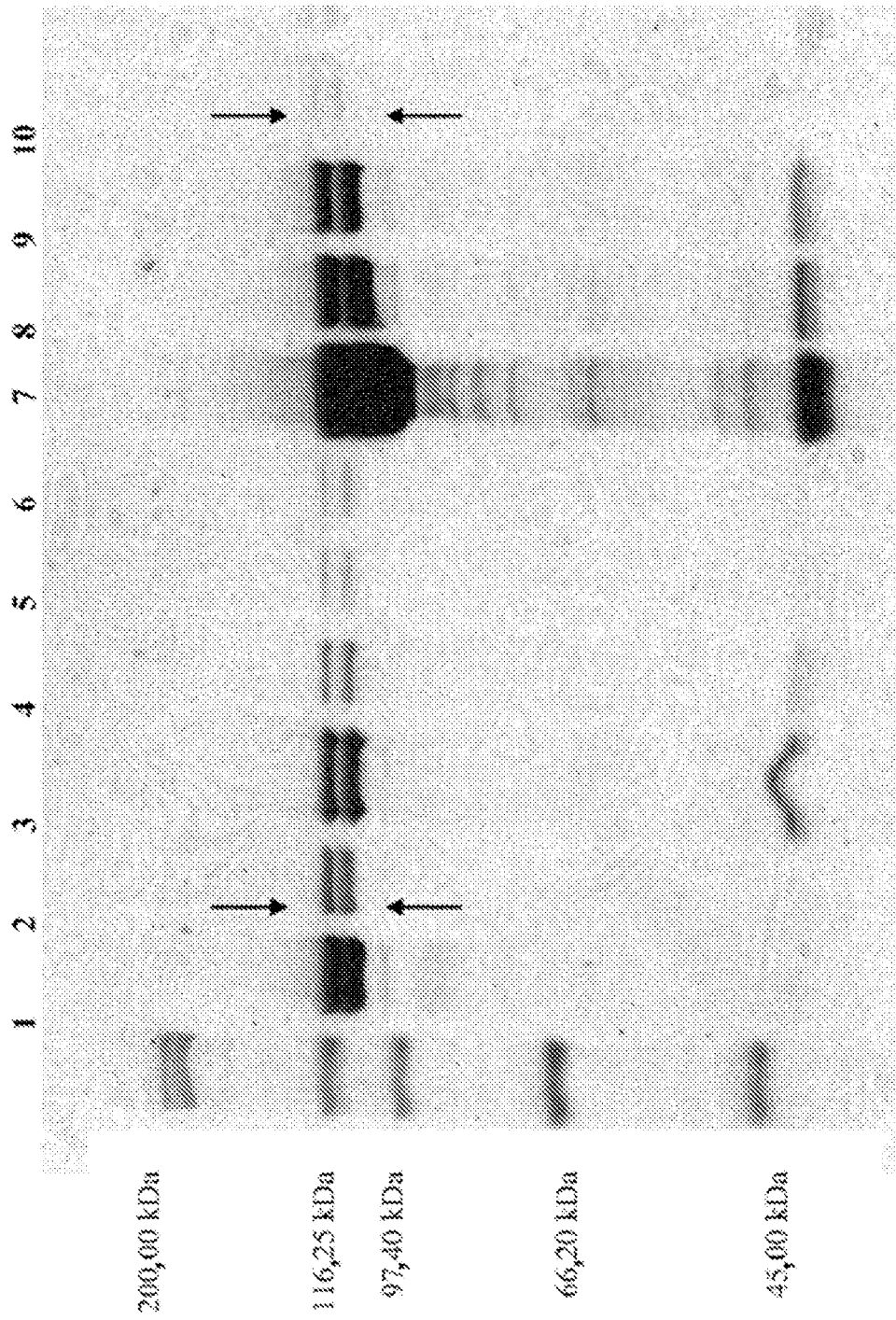


FIG. 15

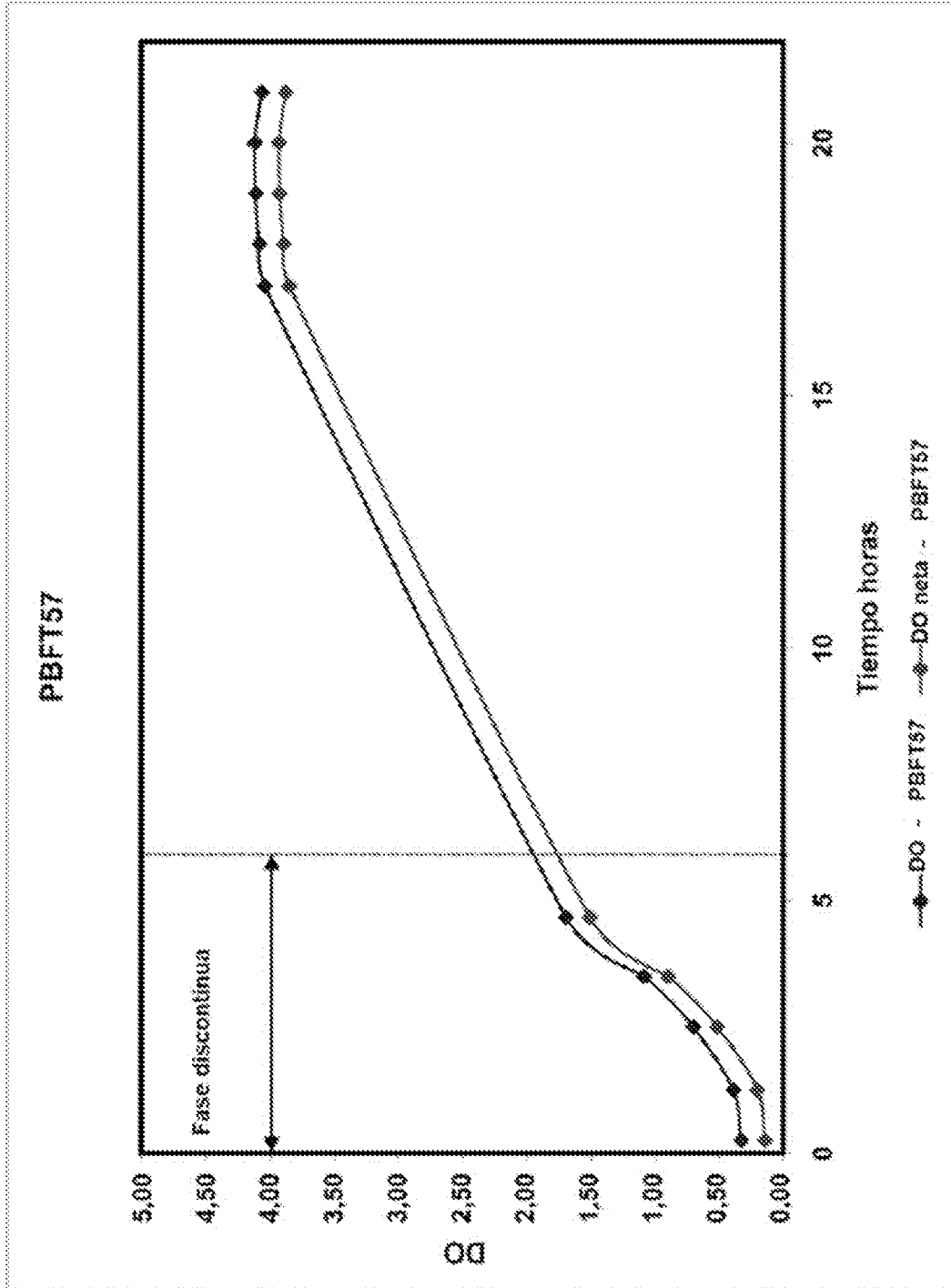


FIG. 16

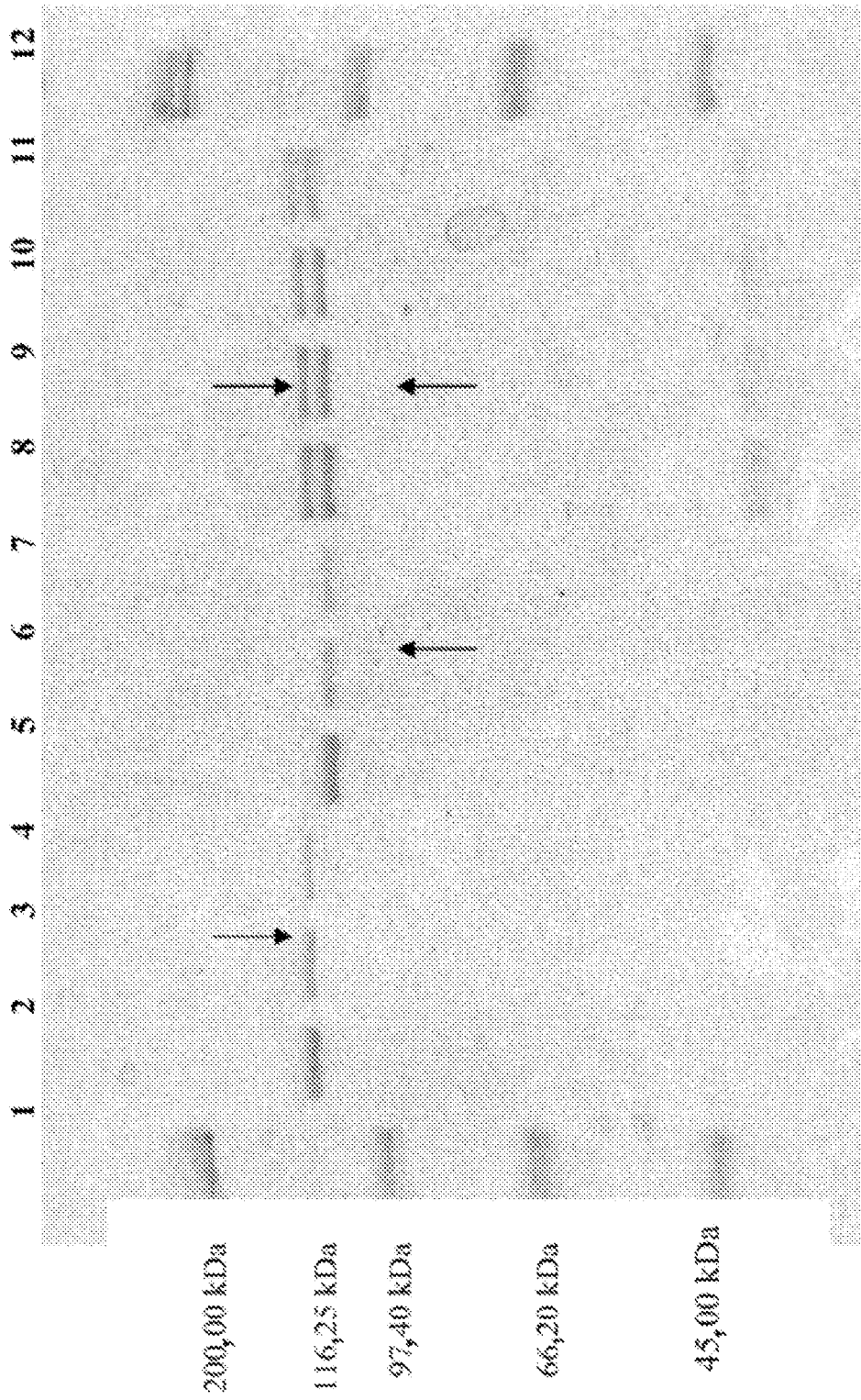


FIG. 17

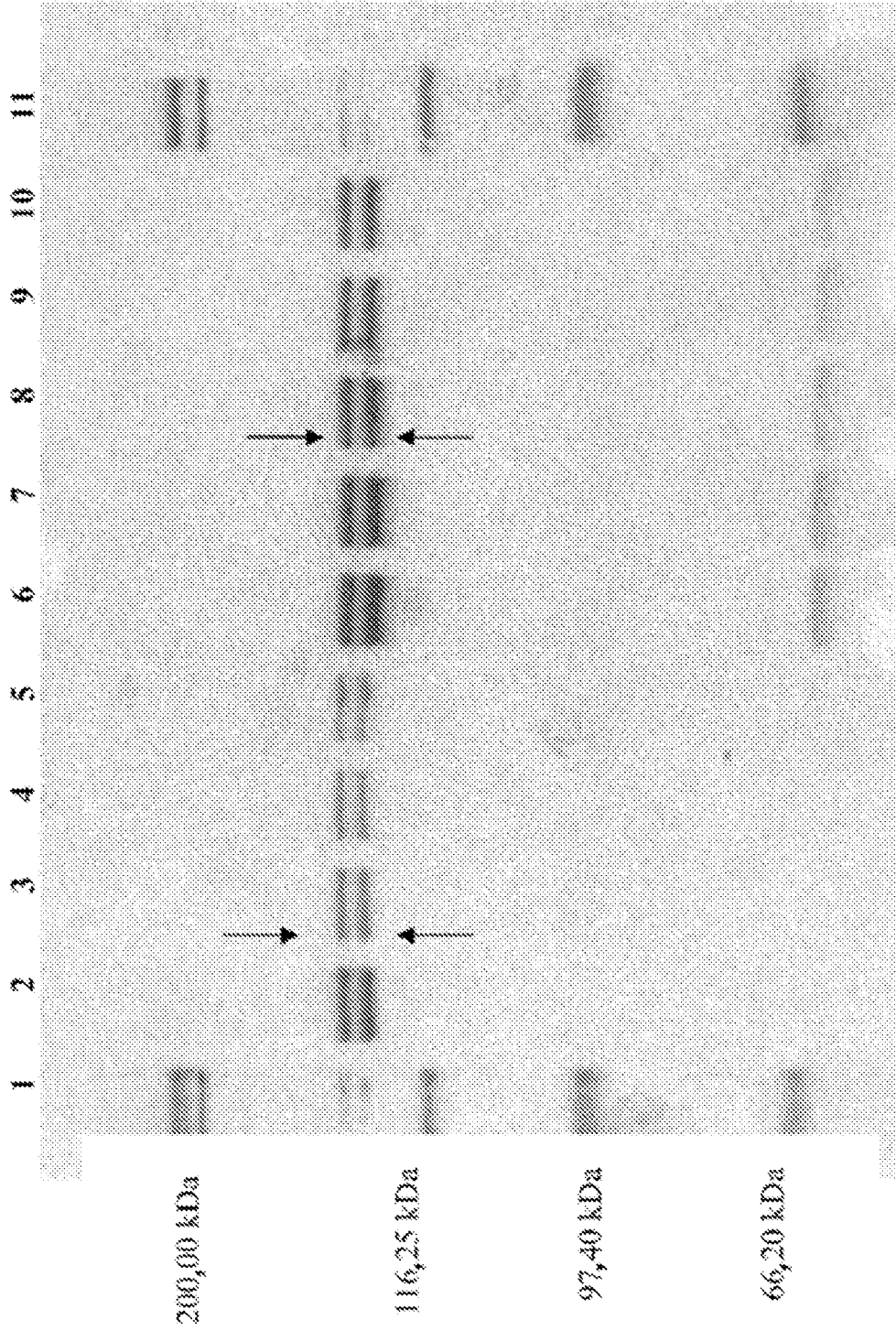


FIG. 18A

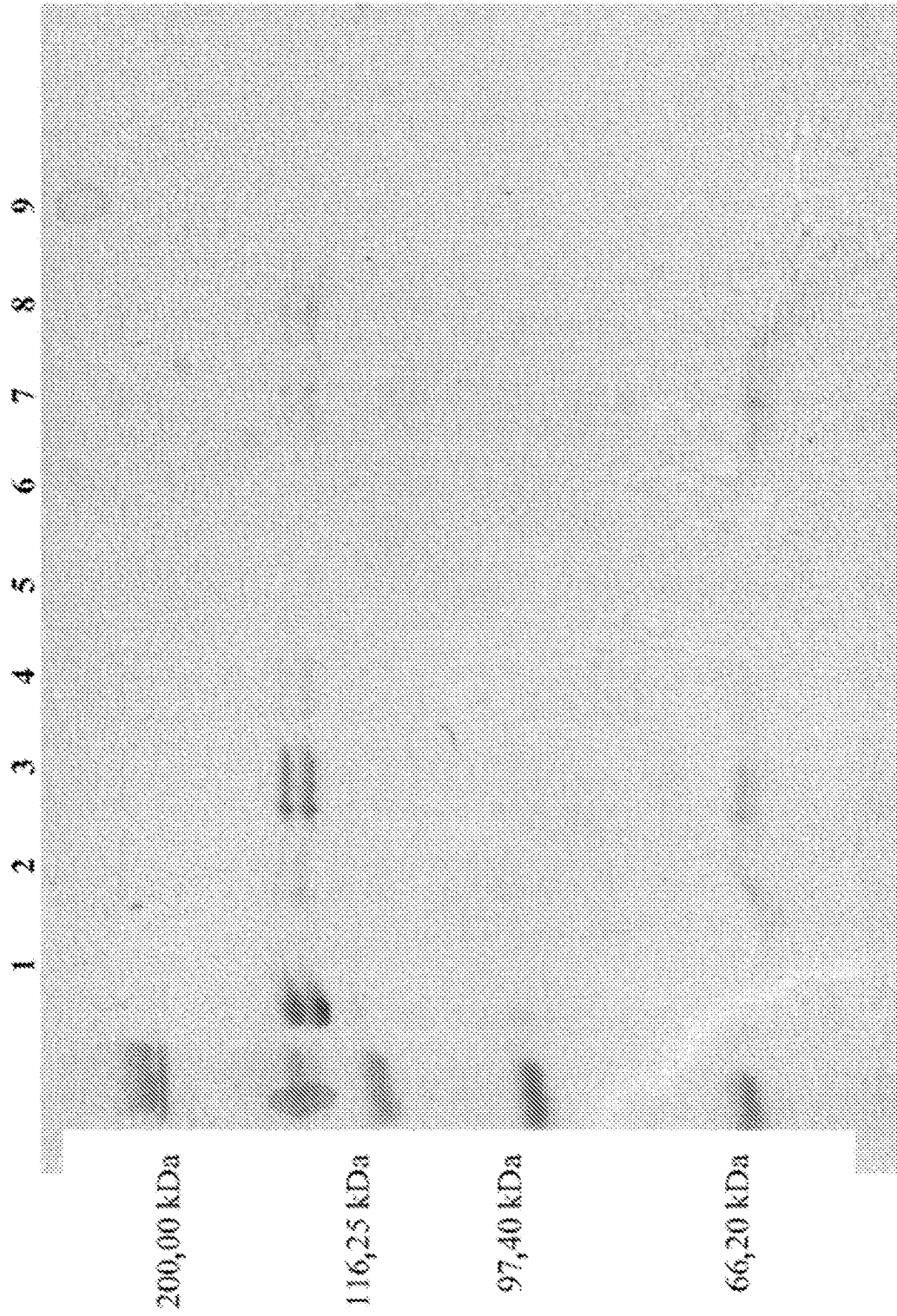


FIG. 18B

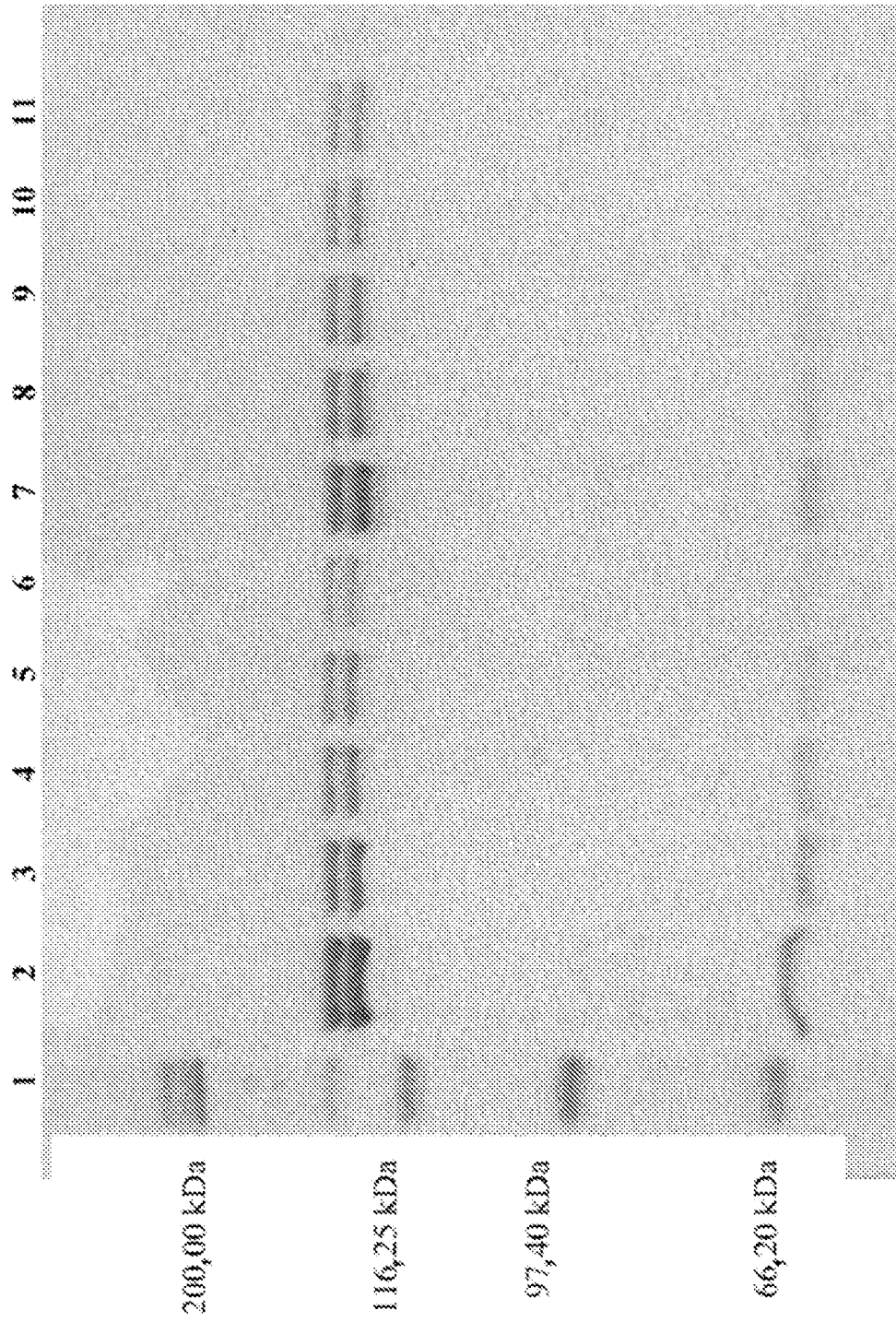


FIG. 19

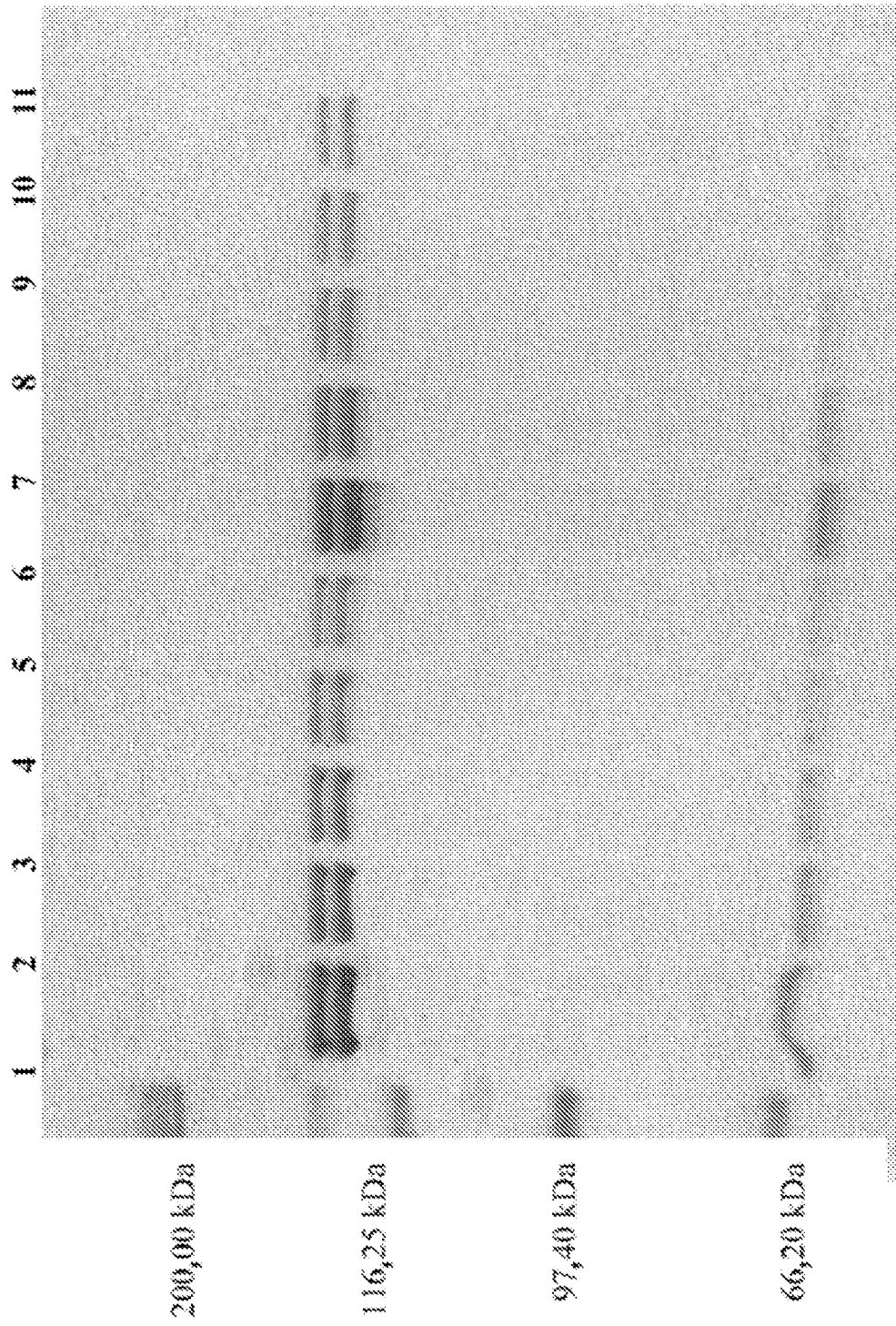


FIG. 20

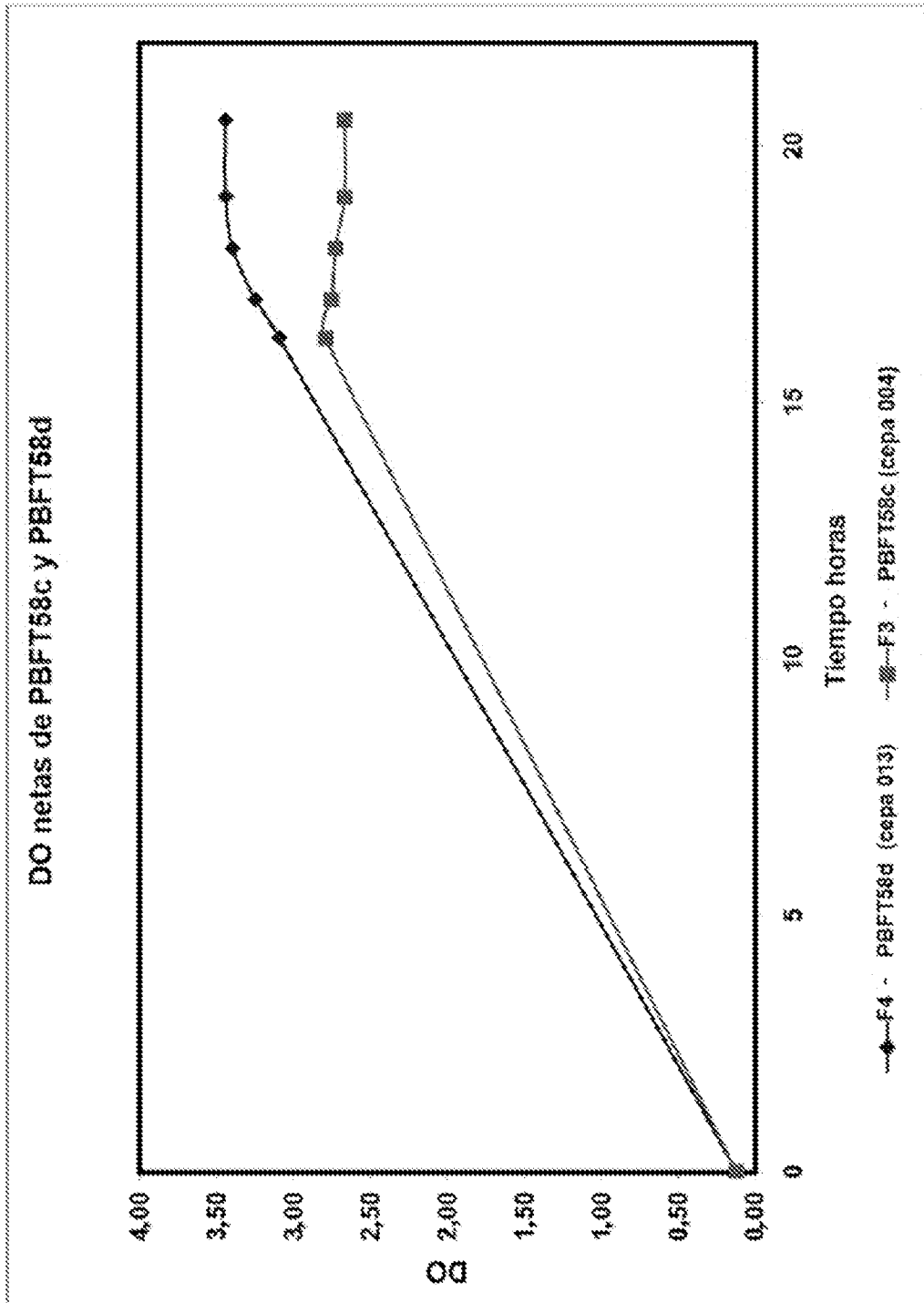


FIG. 21

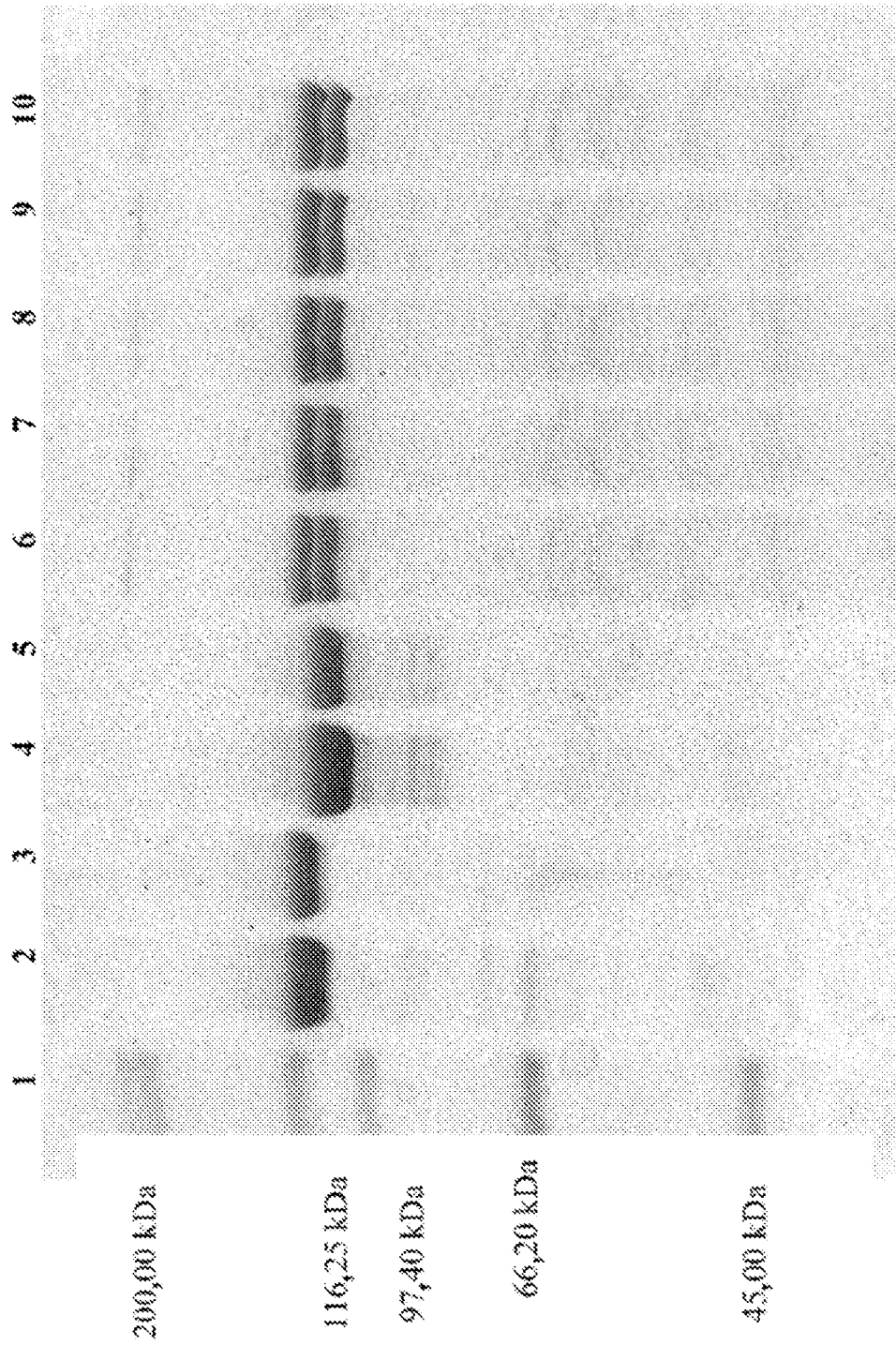


FIG. 22

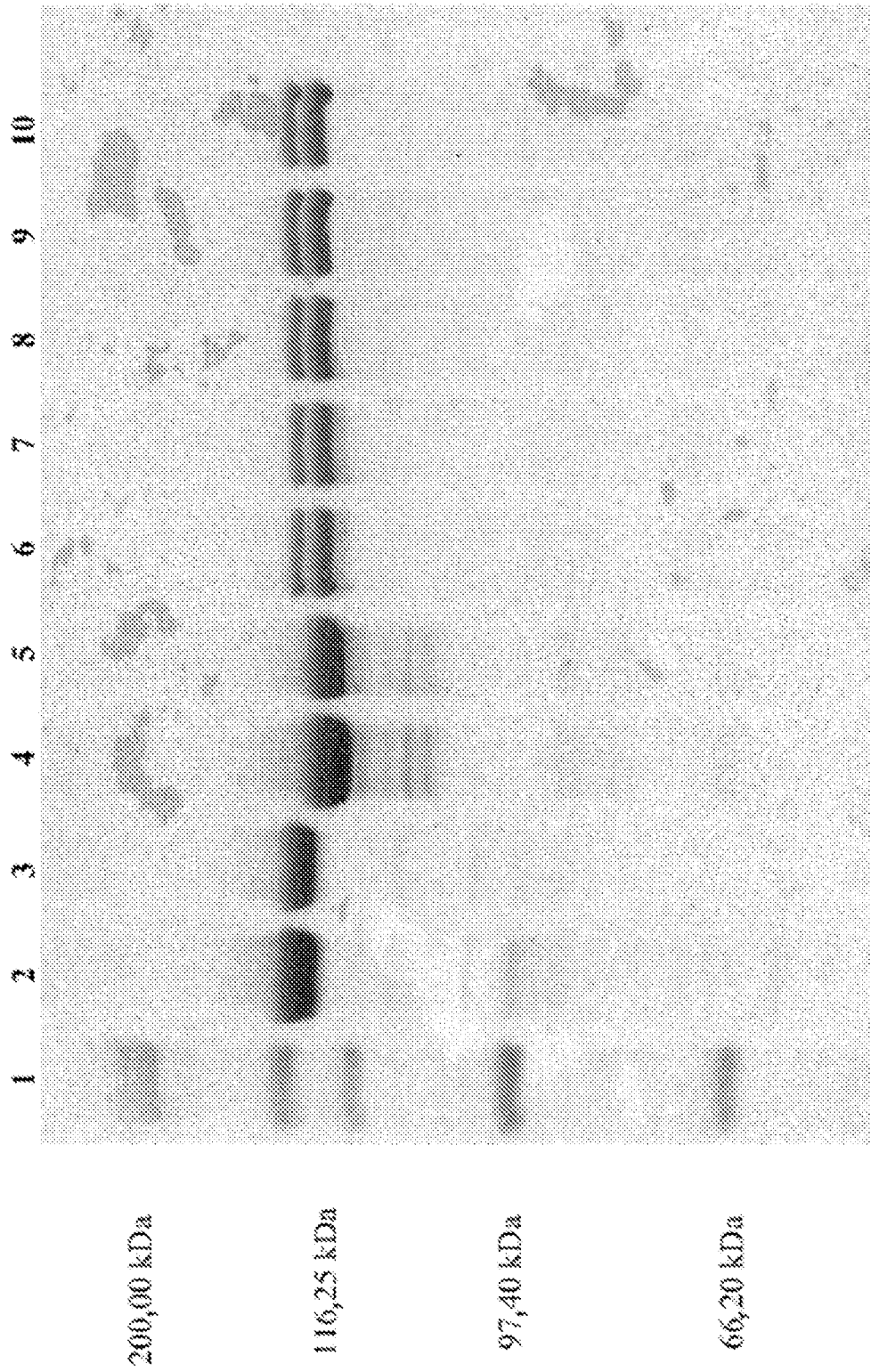


FIG. 23

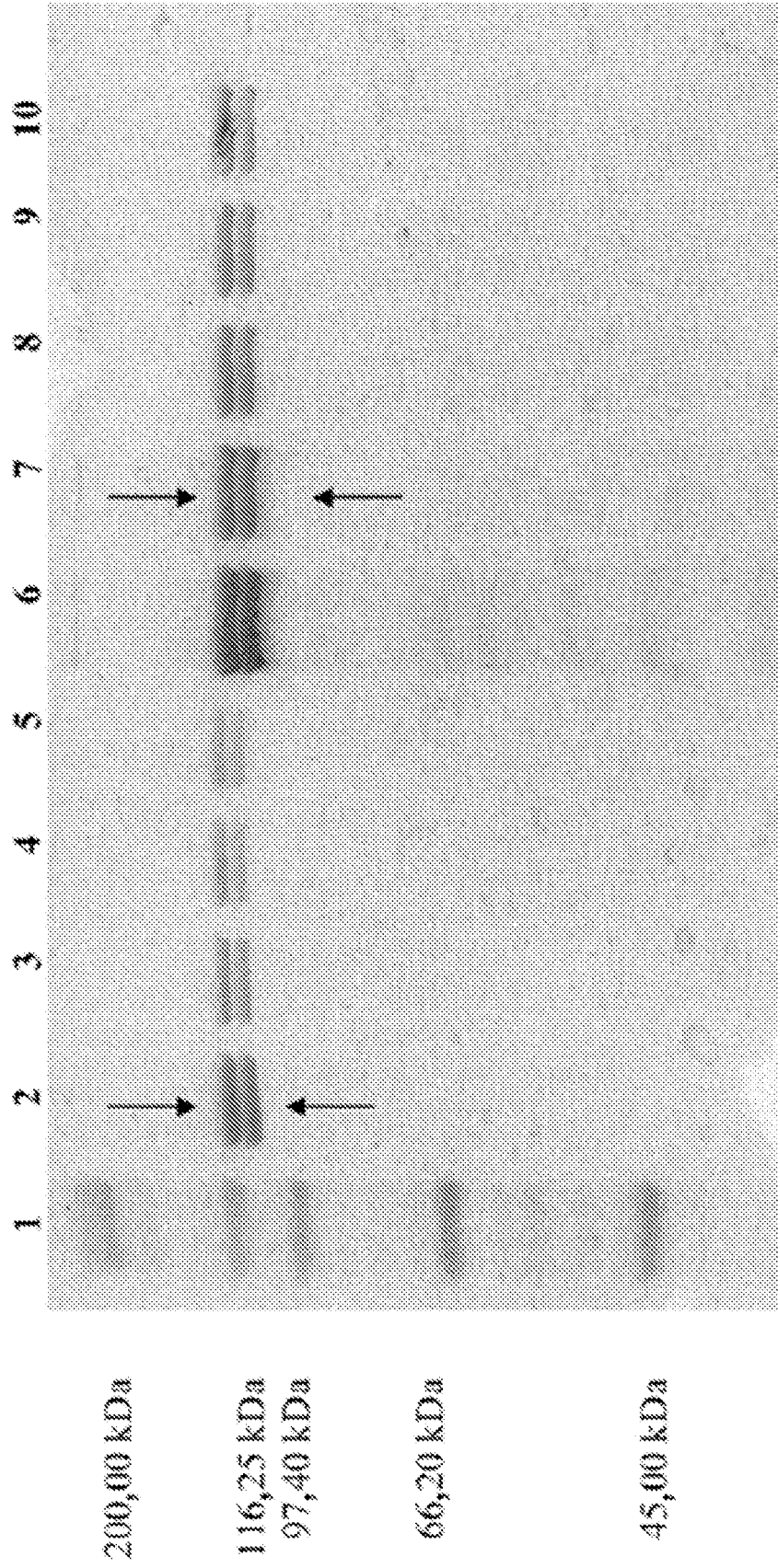


FIG. 24

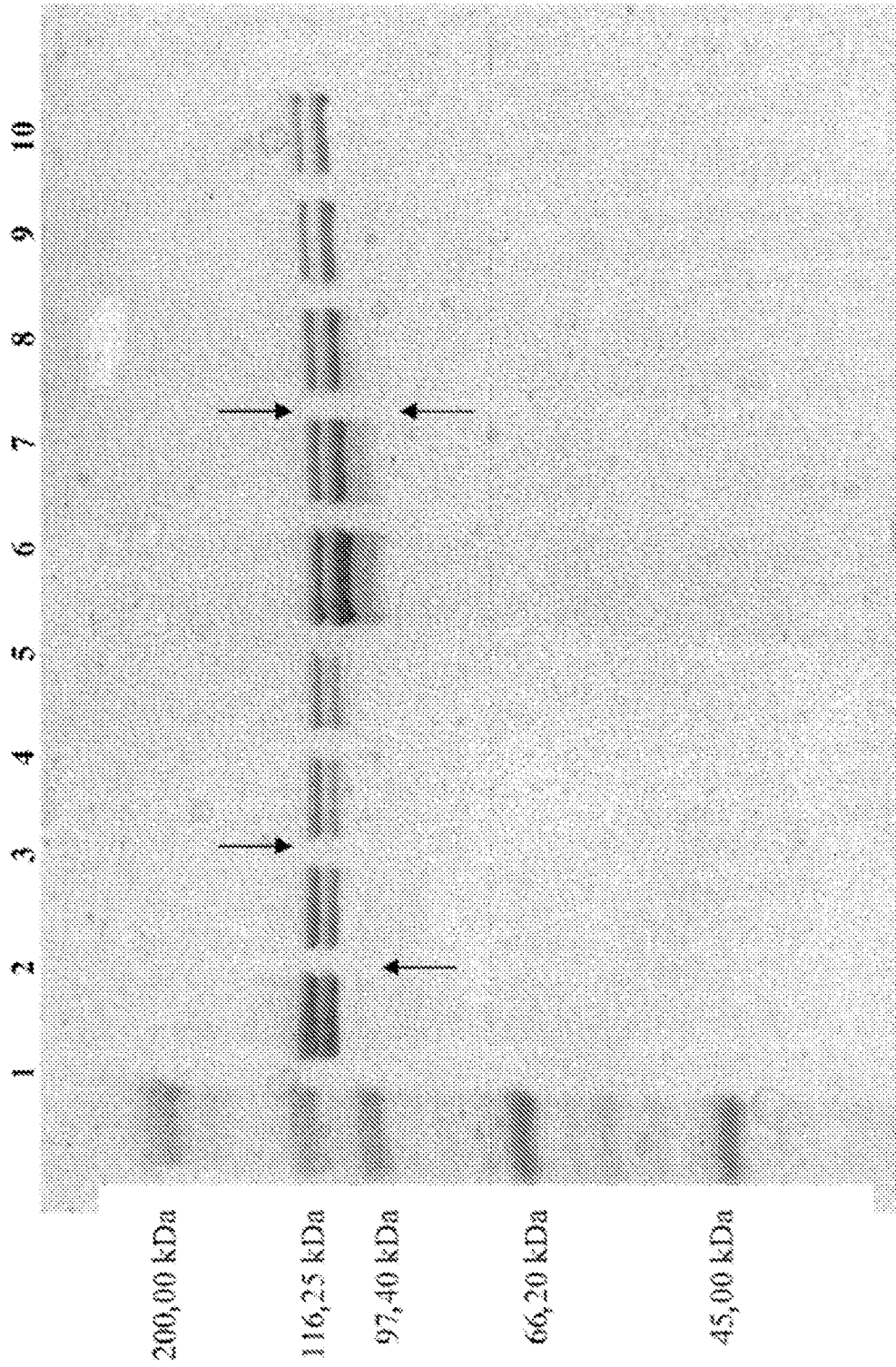


FIG. 25

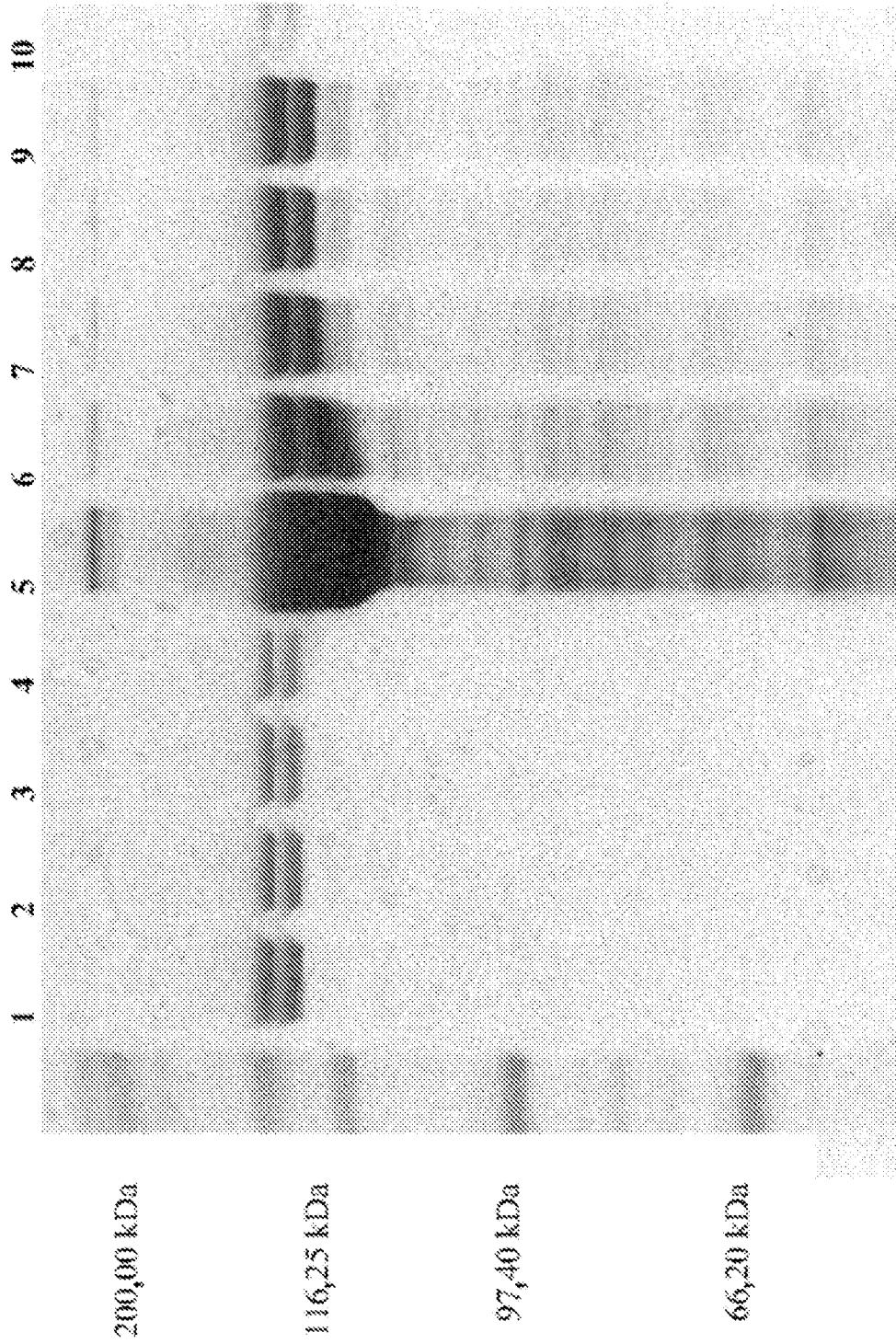


FIG. 26

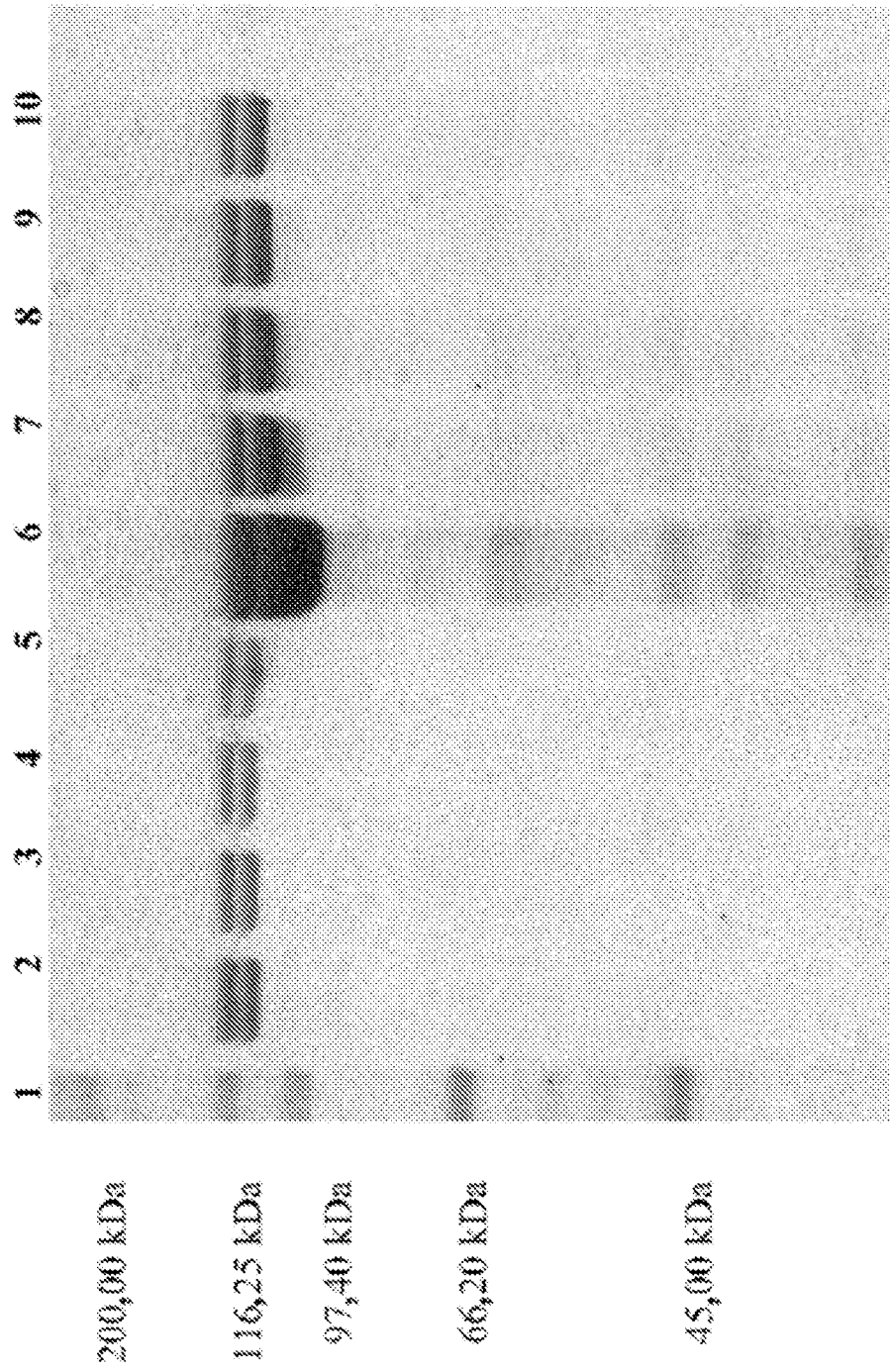


FIG. 27

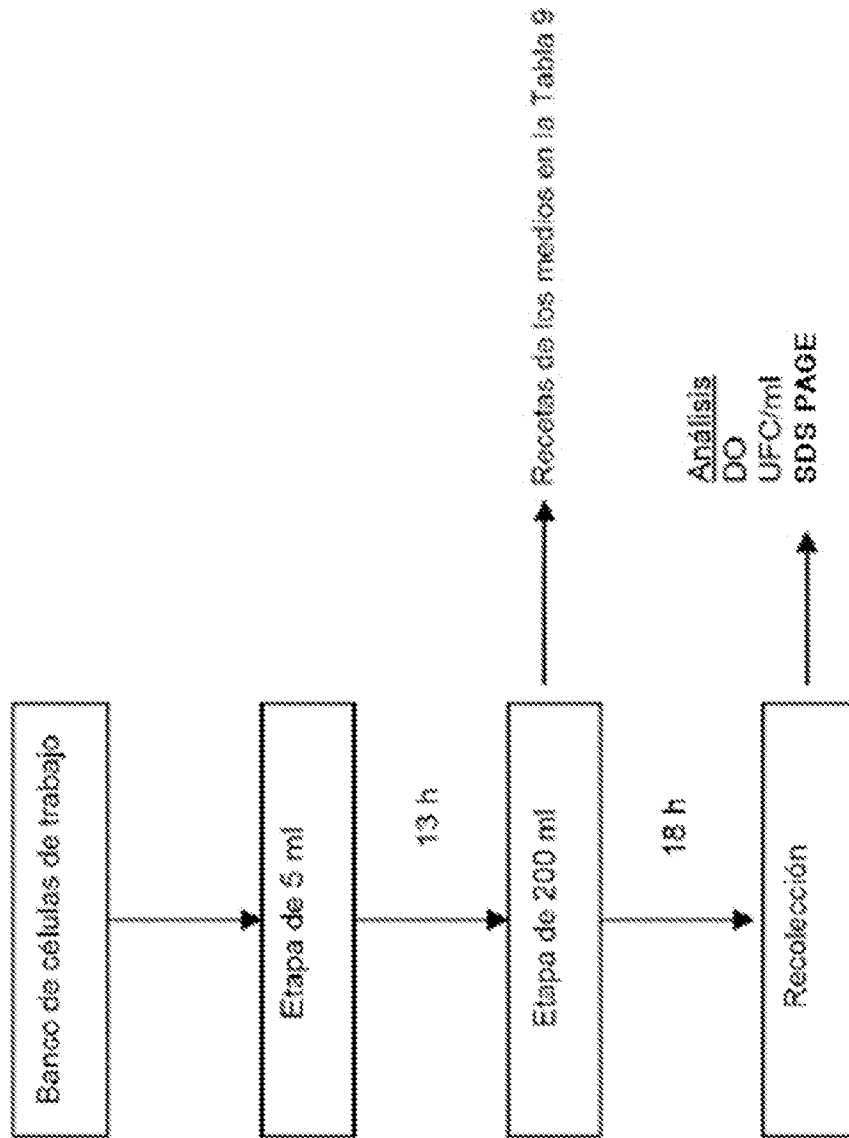


FIG. 28

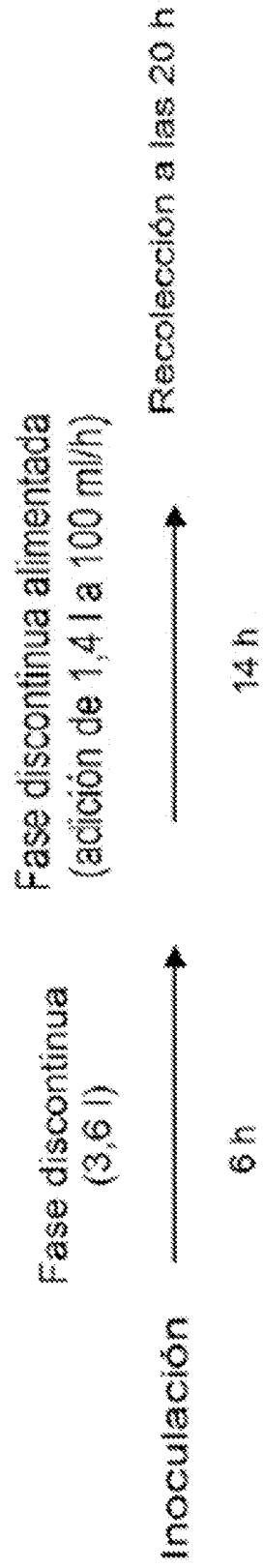


FIG. 29

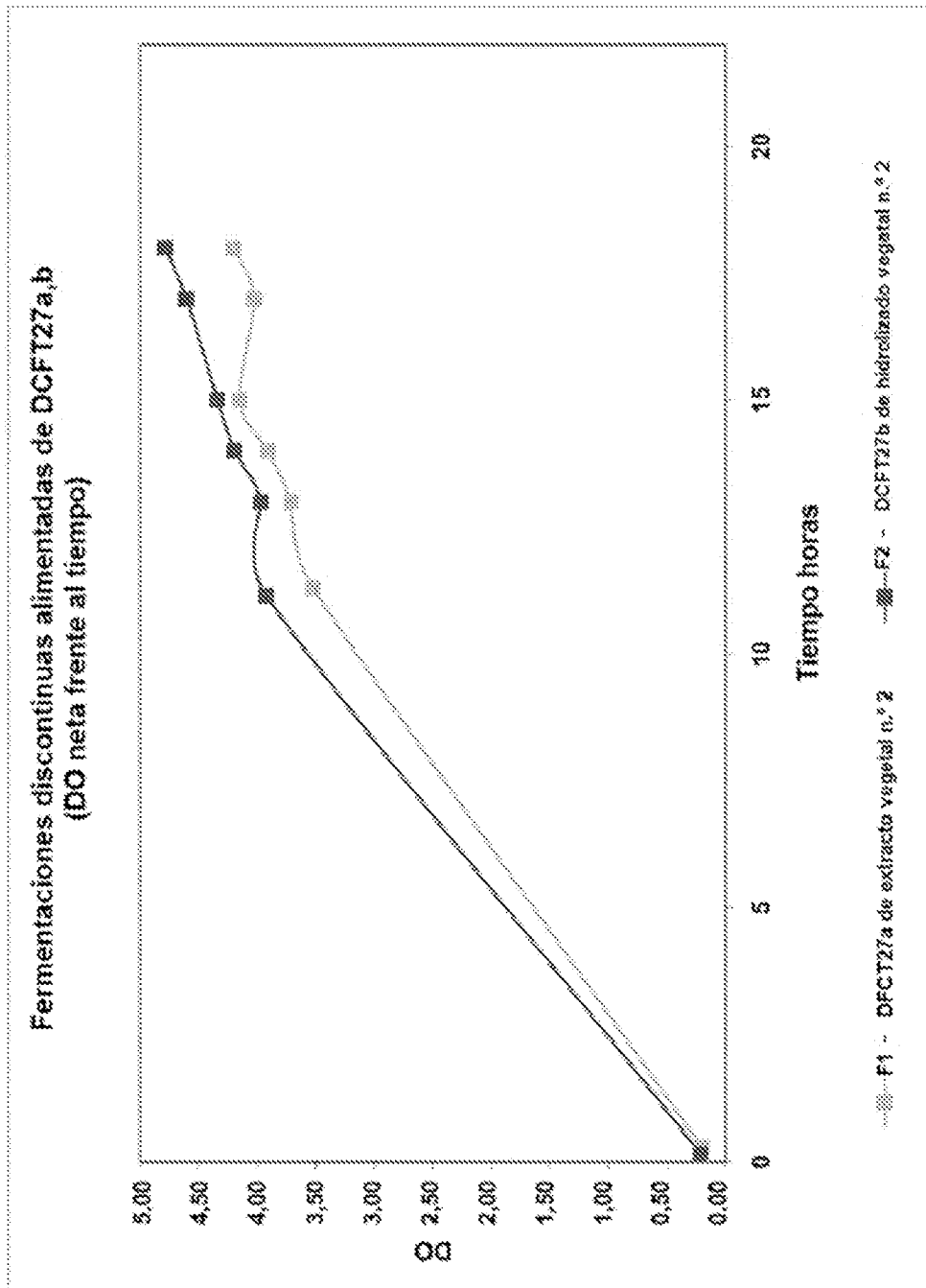


FIG. 30

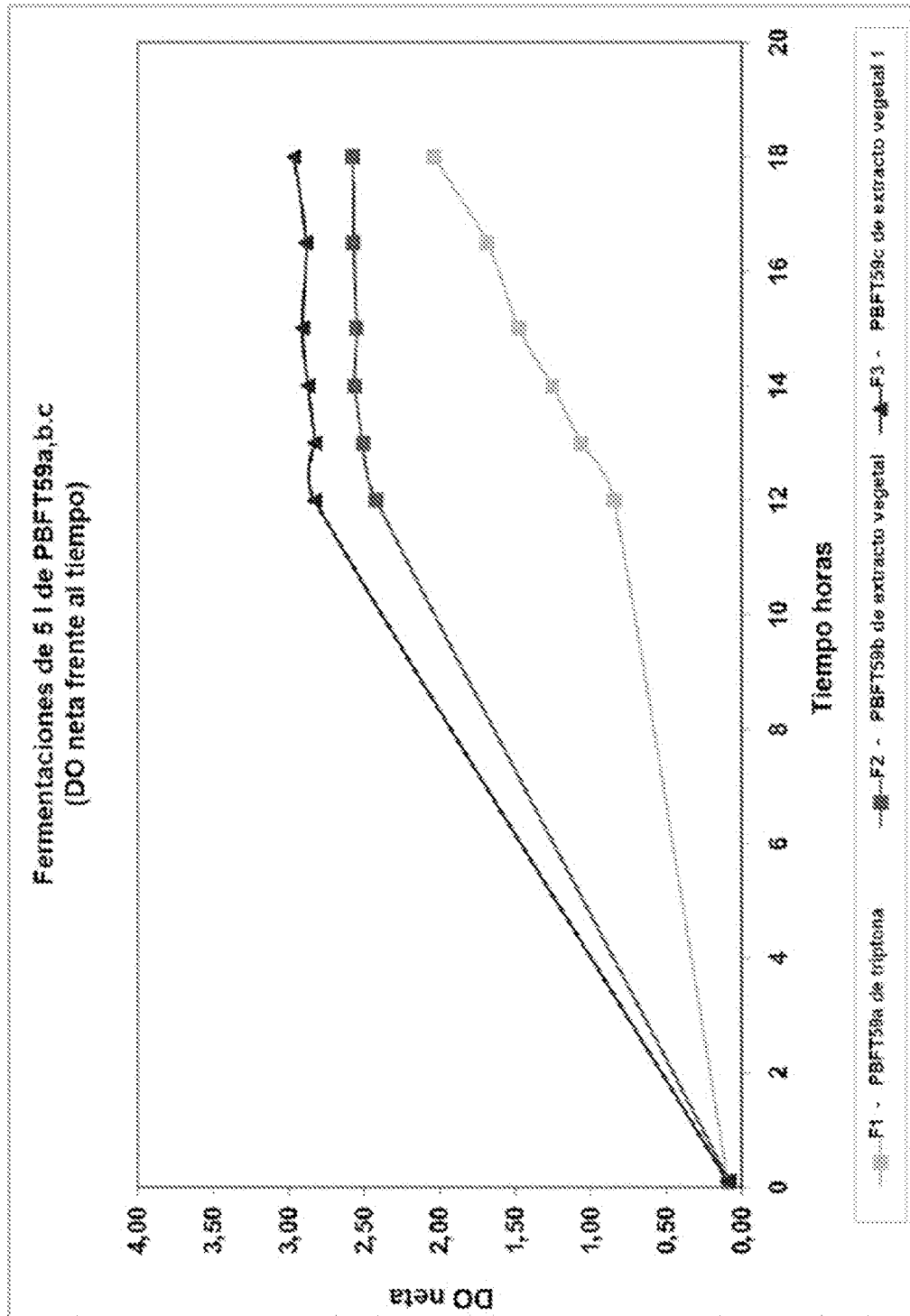


FIG. 31

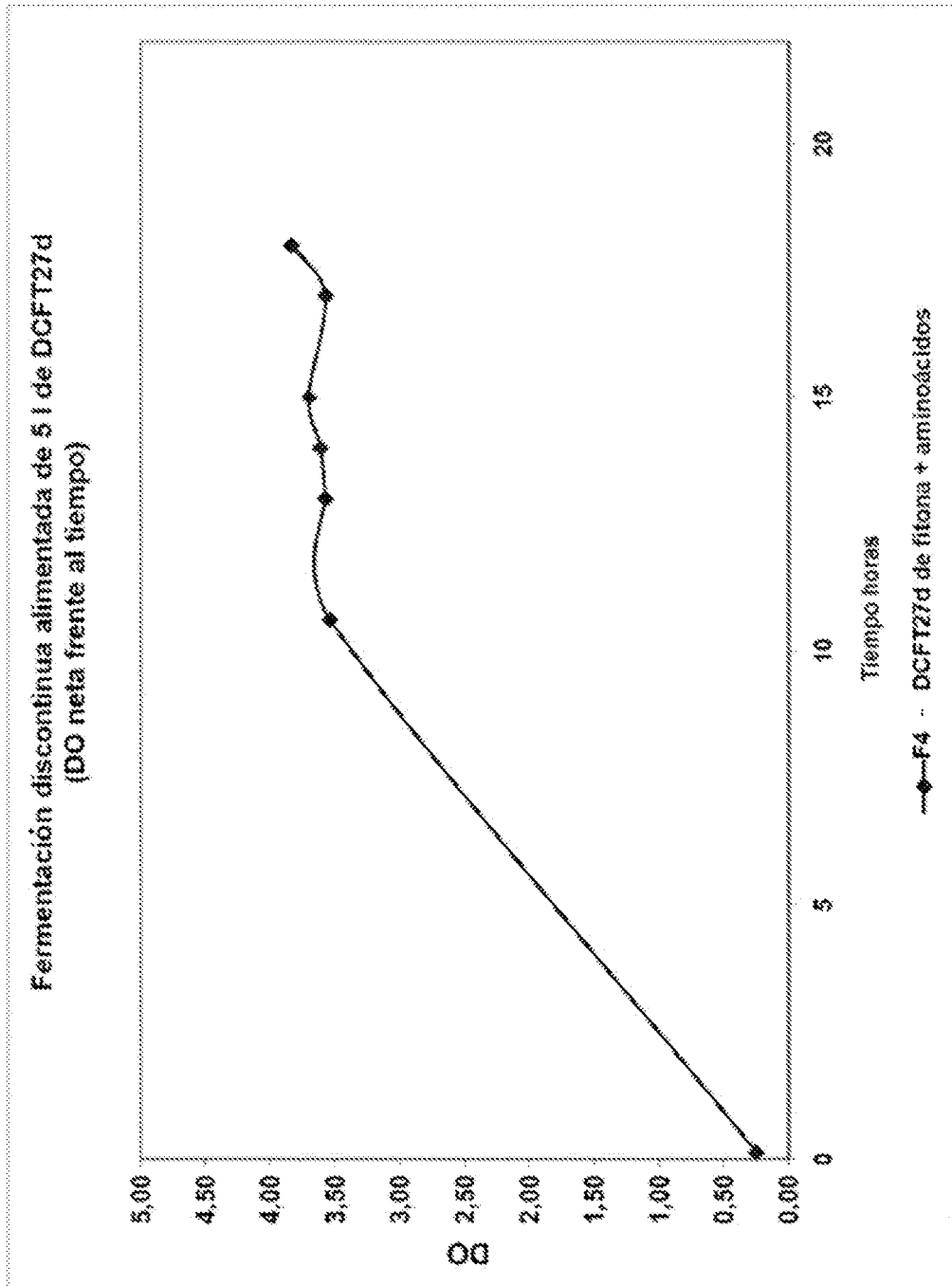


FIG. 32

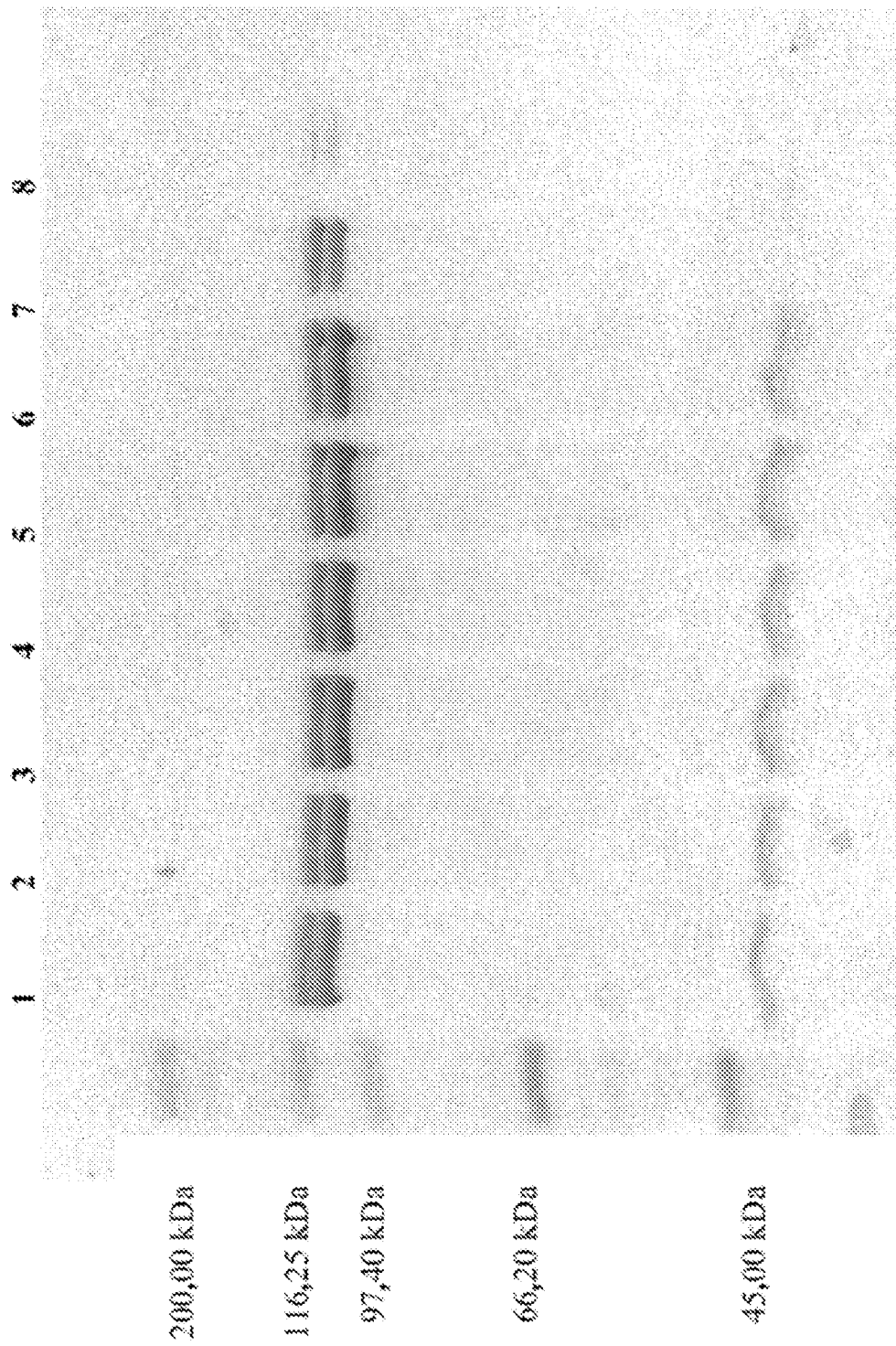


FIG. 33A

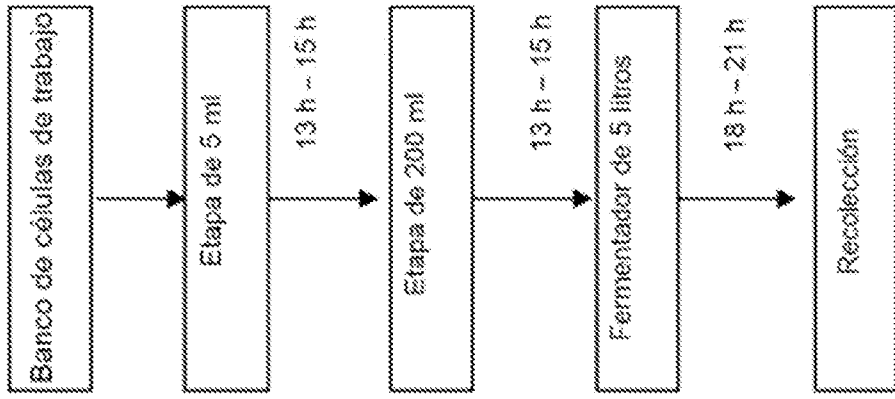


FIG. 33B

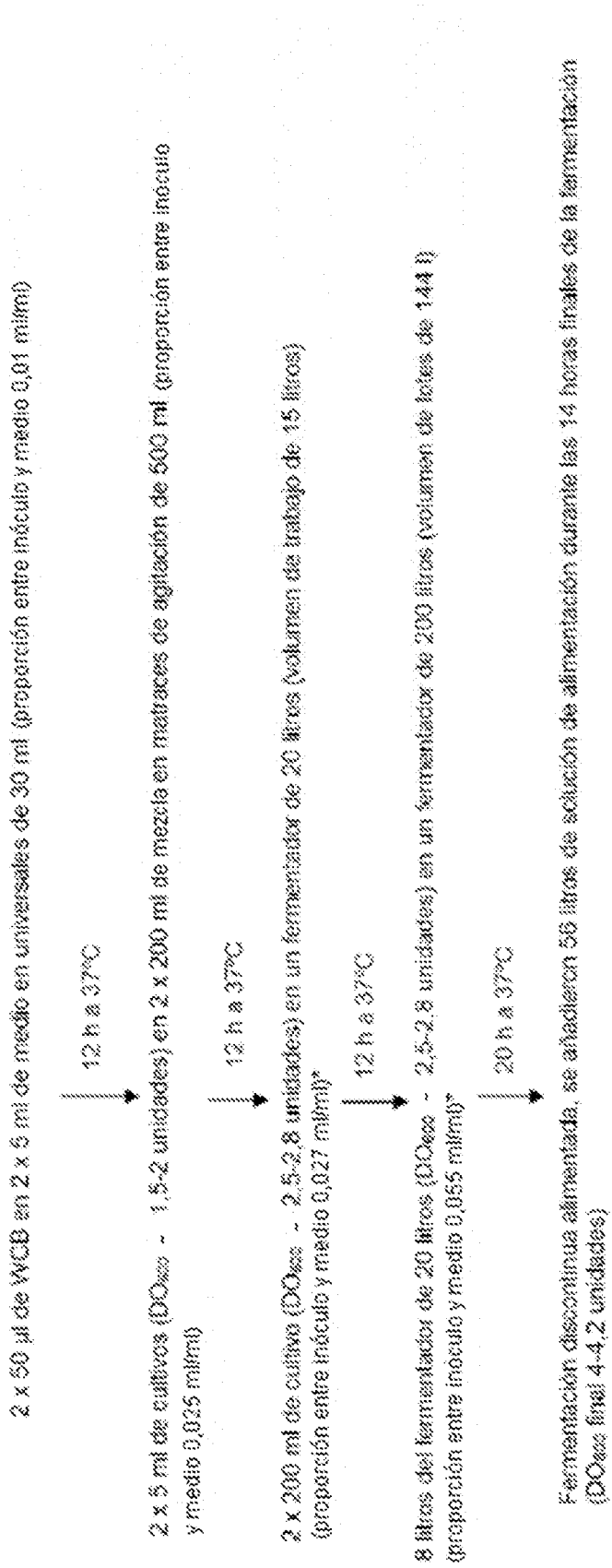


FIG. 33C

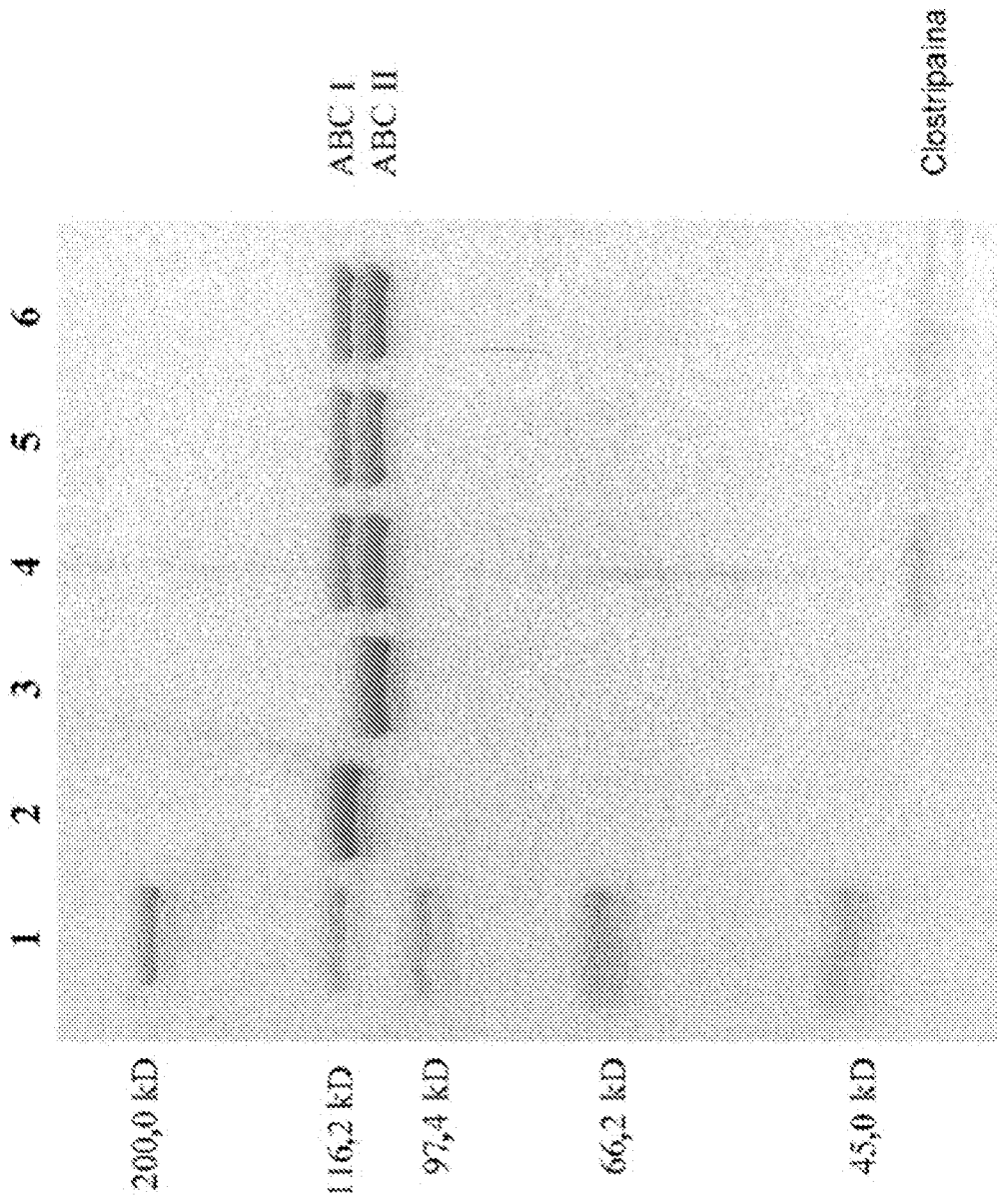


FIG. 36

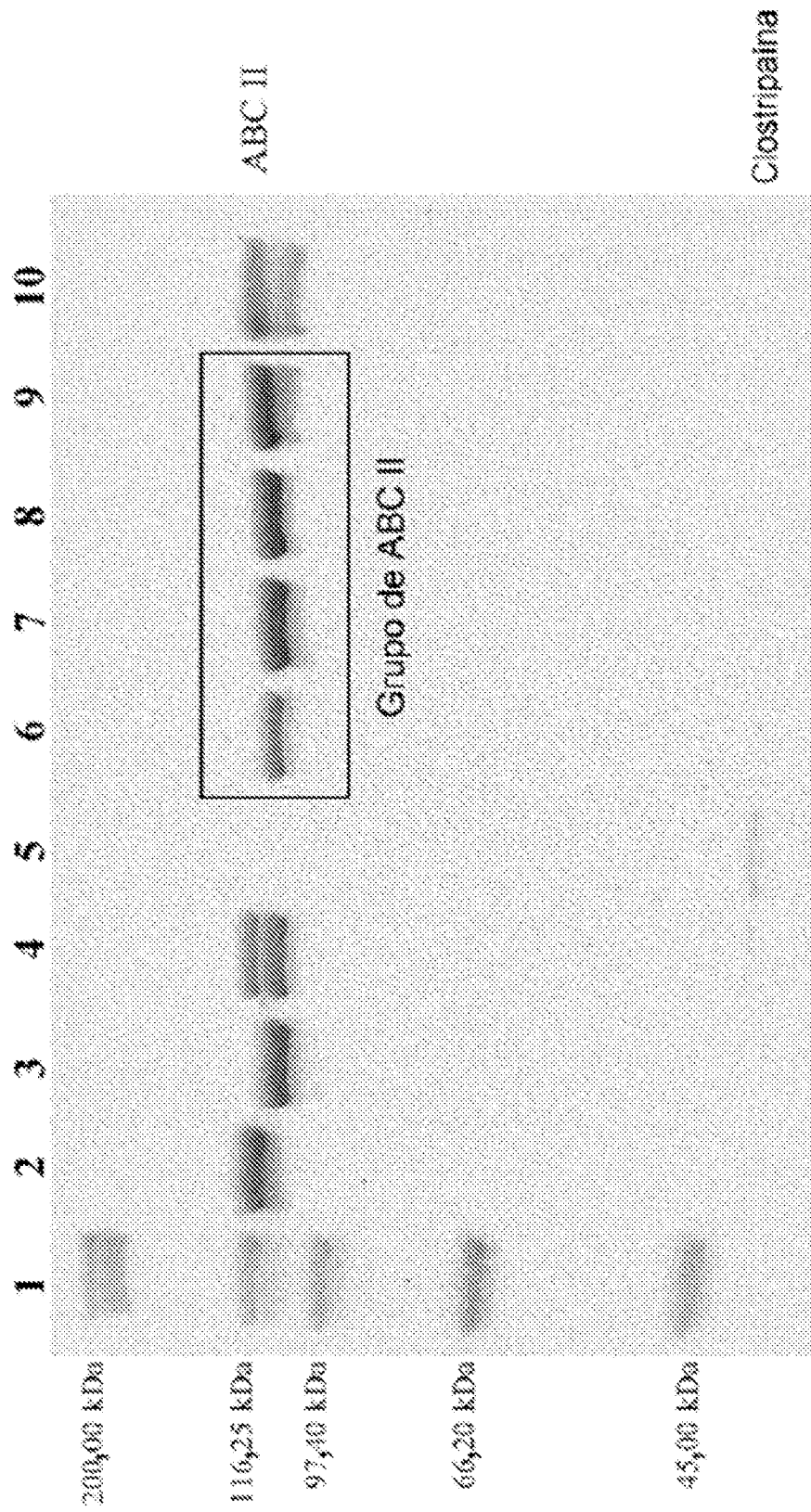


FIG. 38

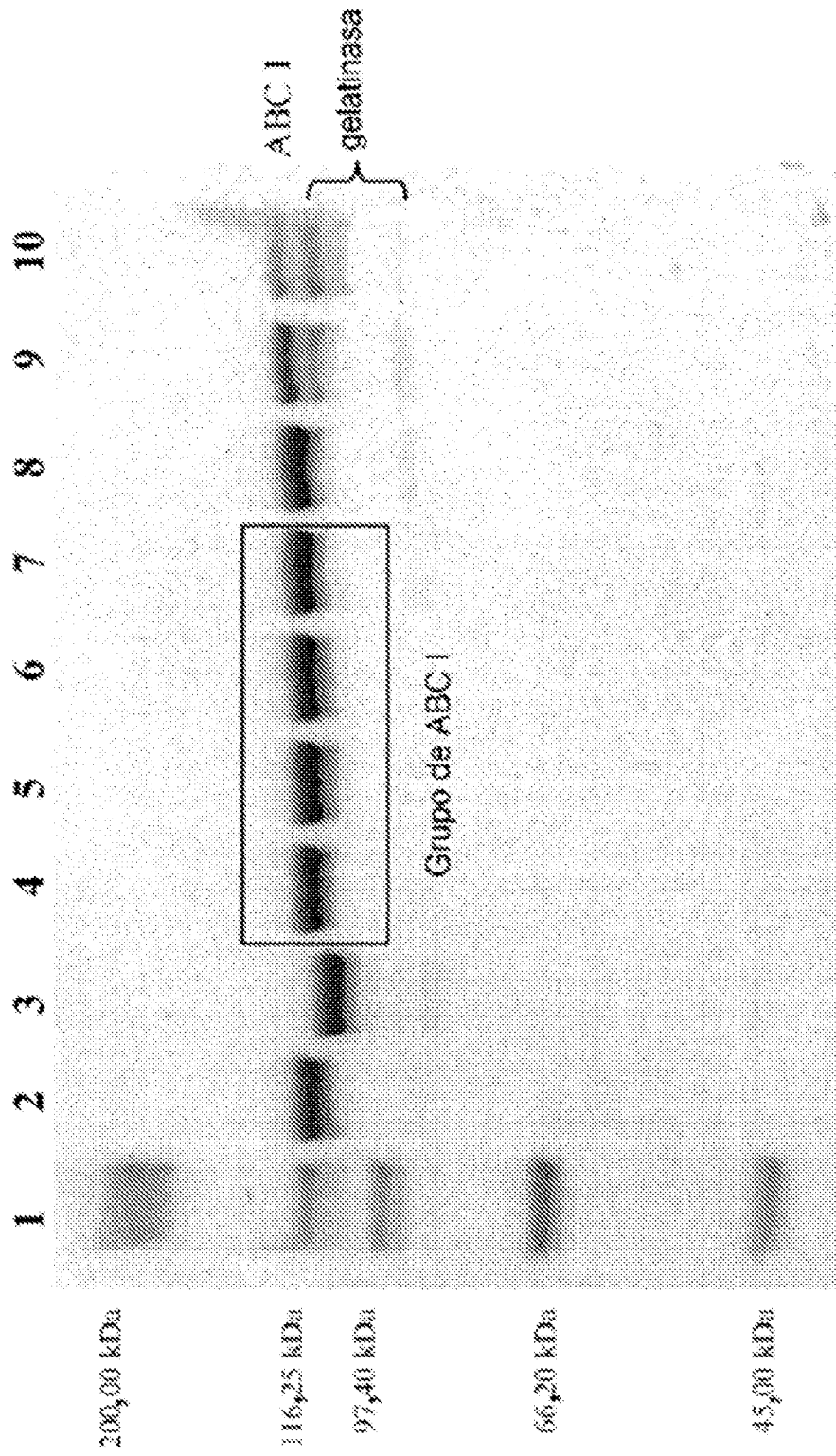


FIG. 39

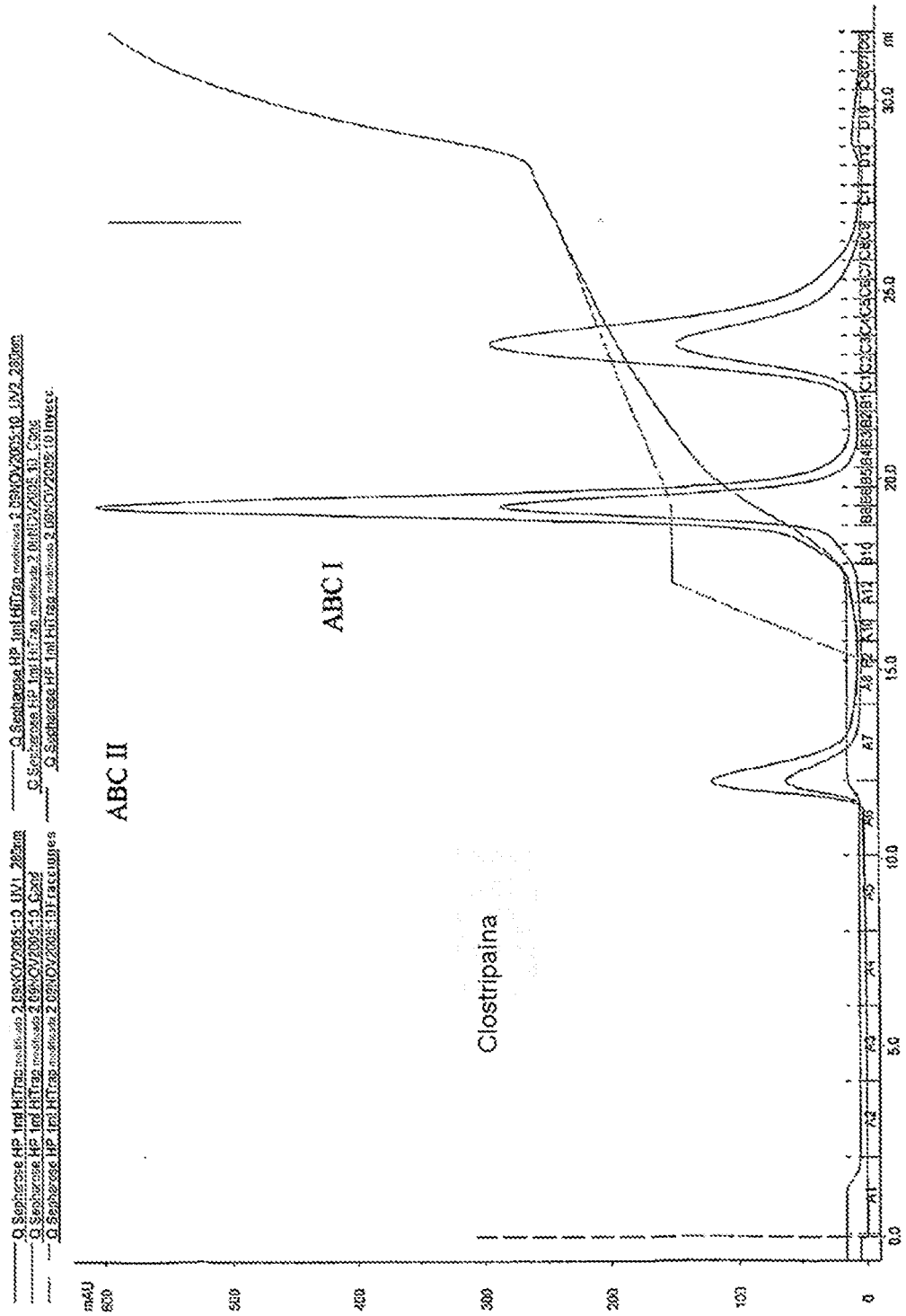


FIG. 40

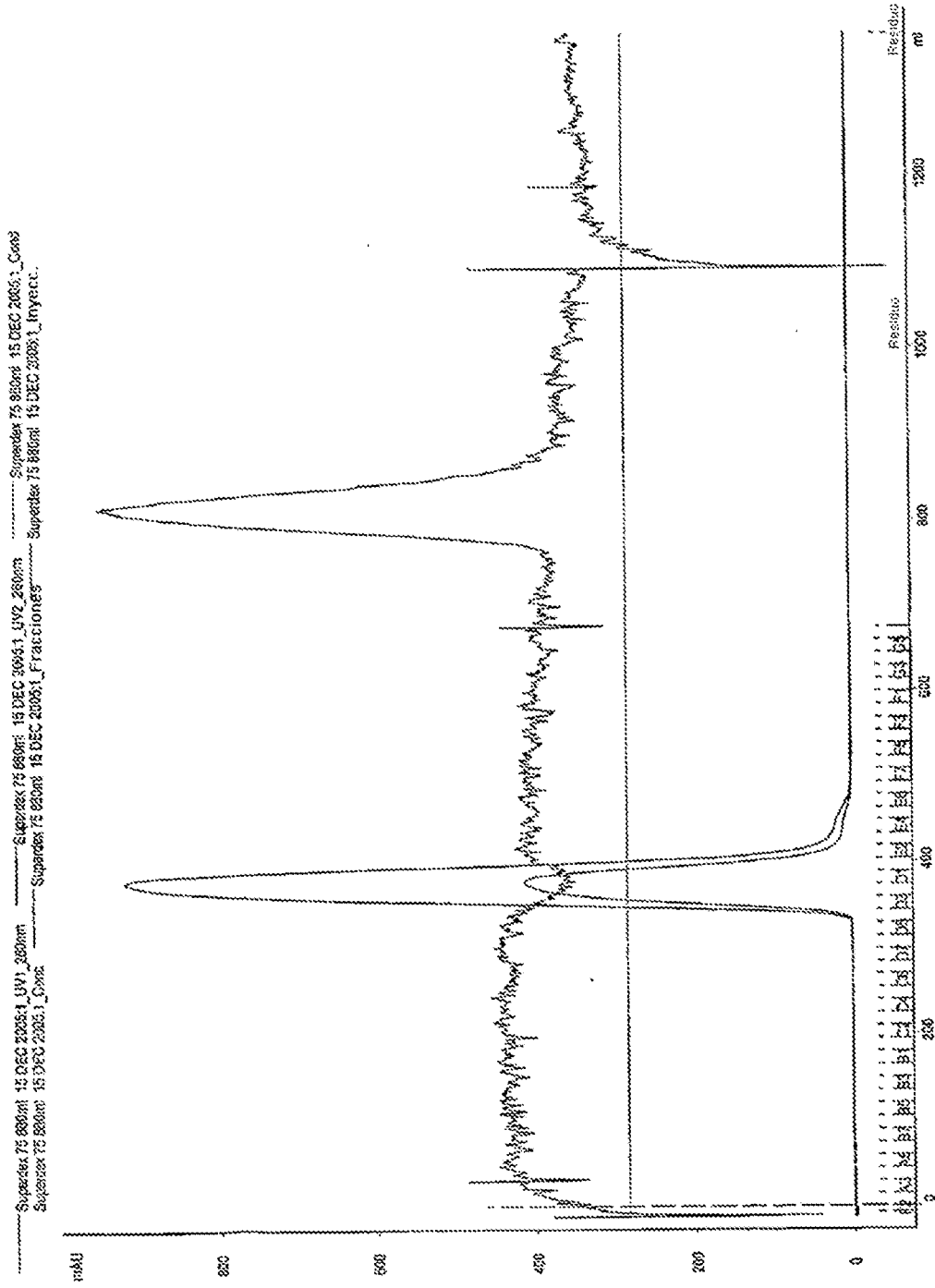


FIG. 4I

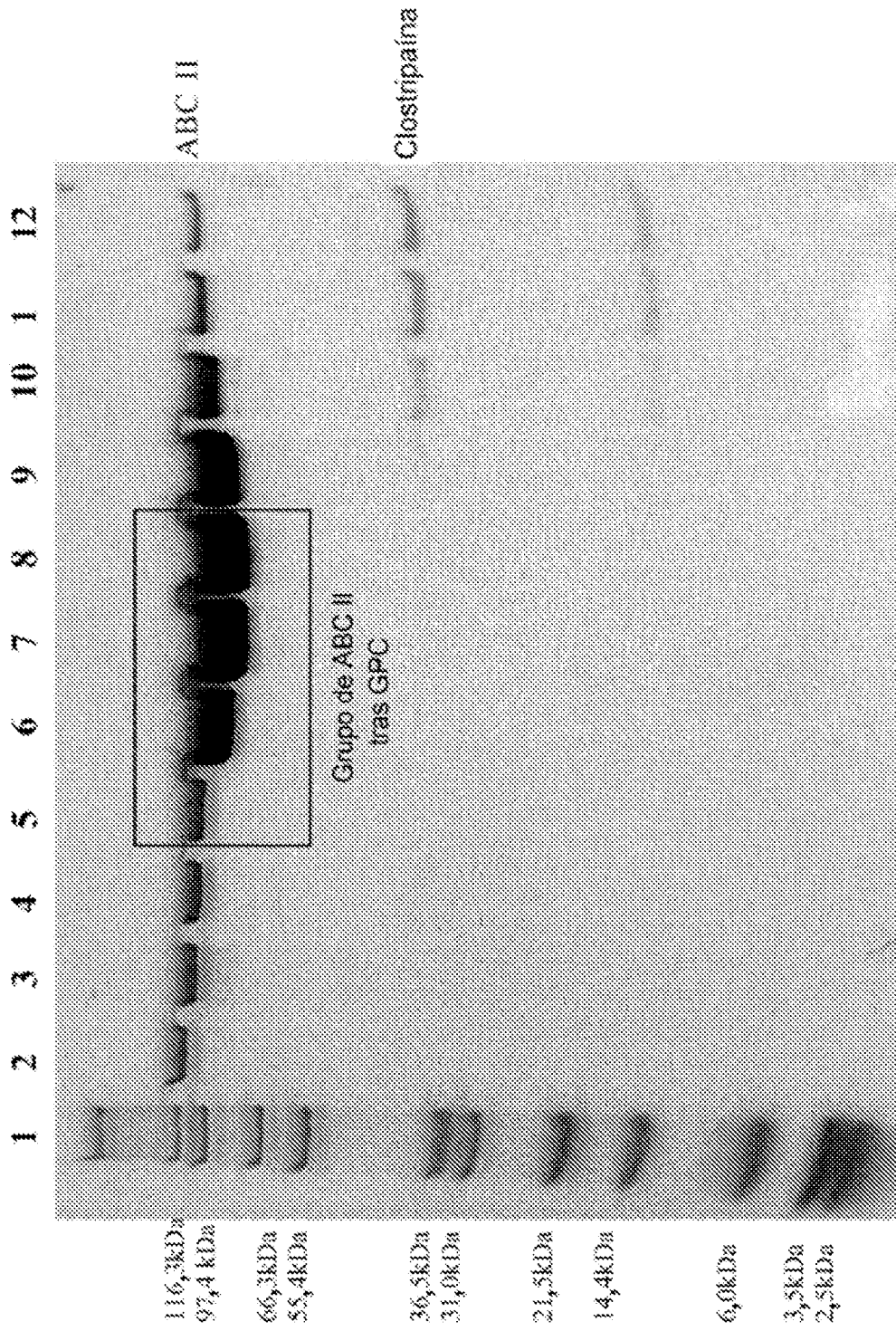


FIG. 42

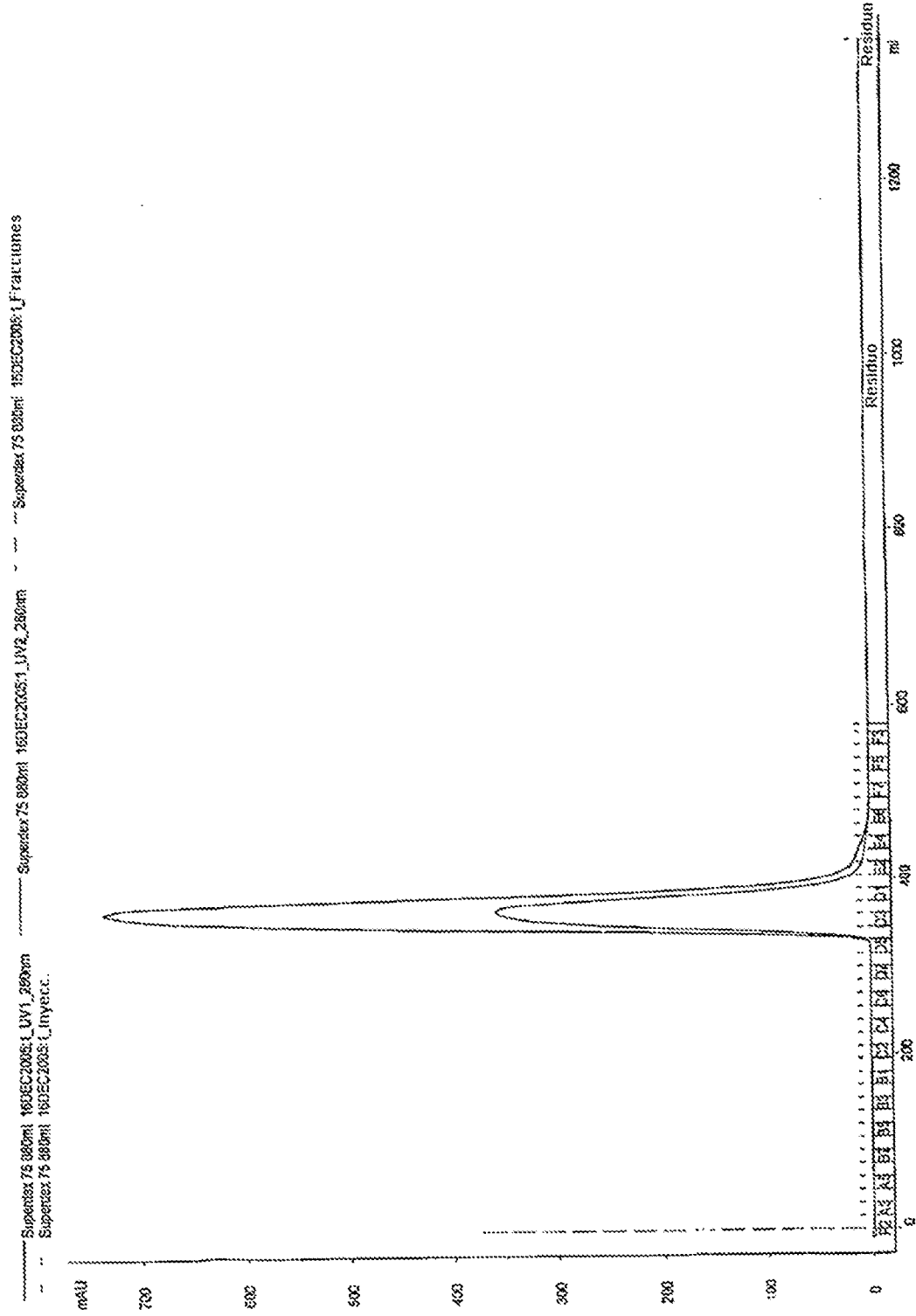


FIG. 43

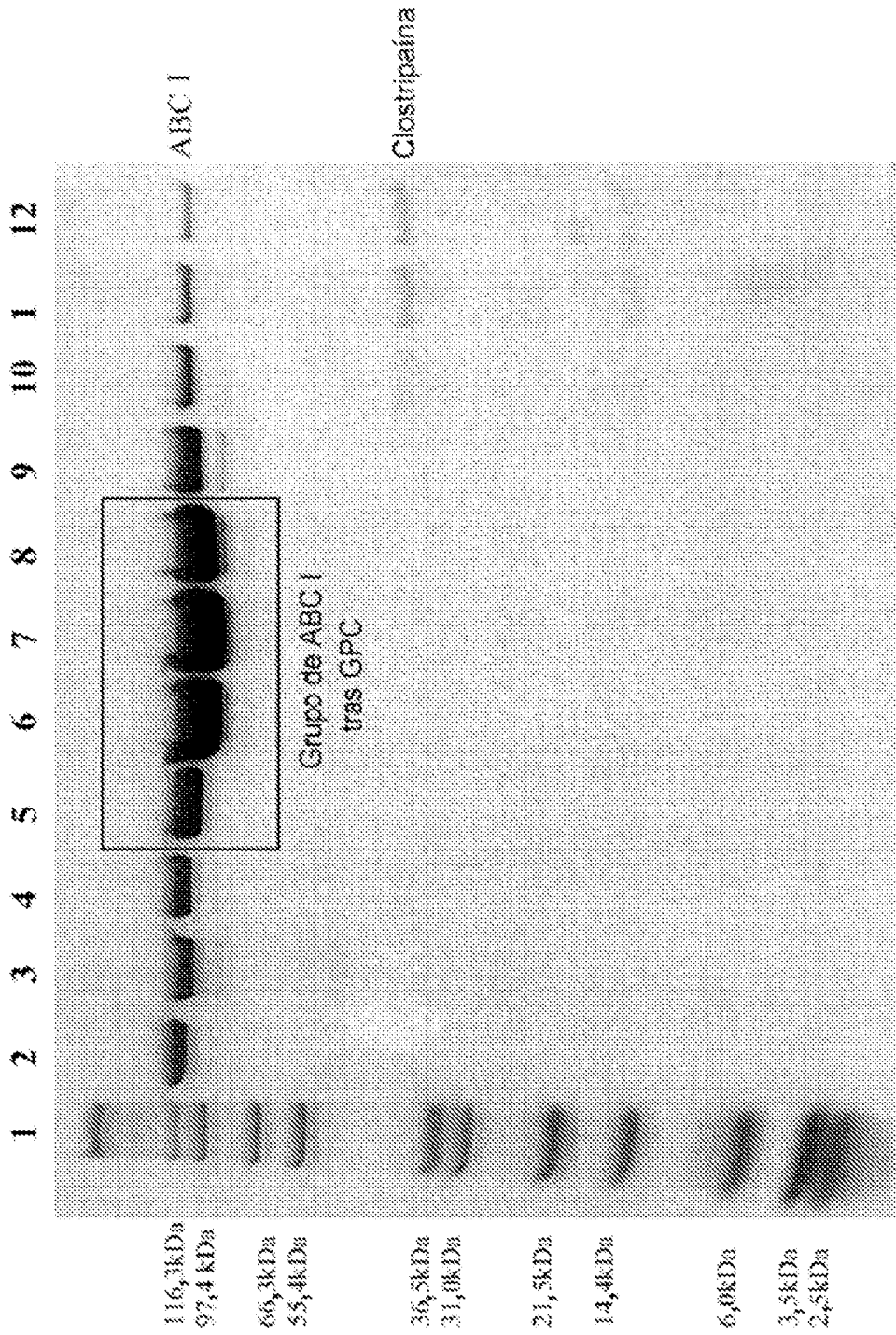


FIG. 44

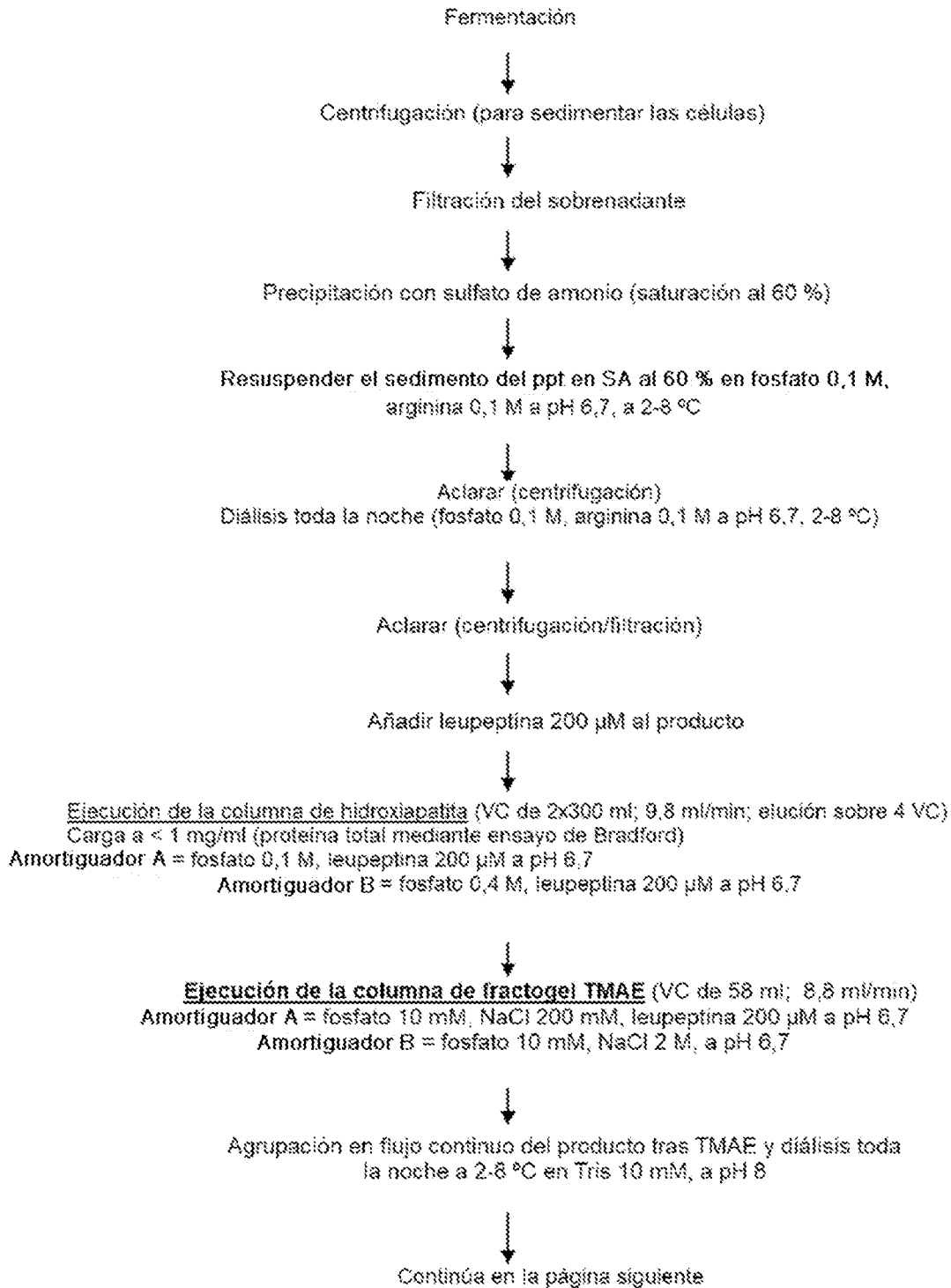


FIG. 45

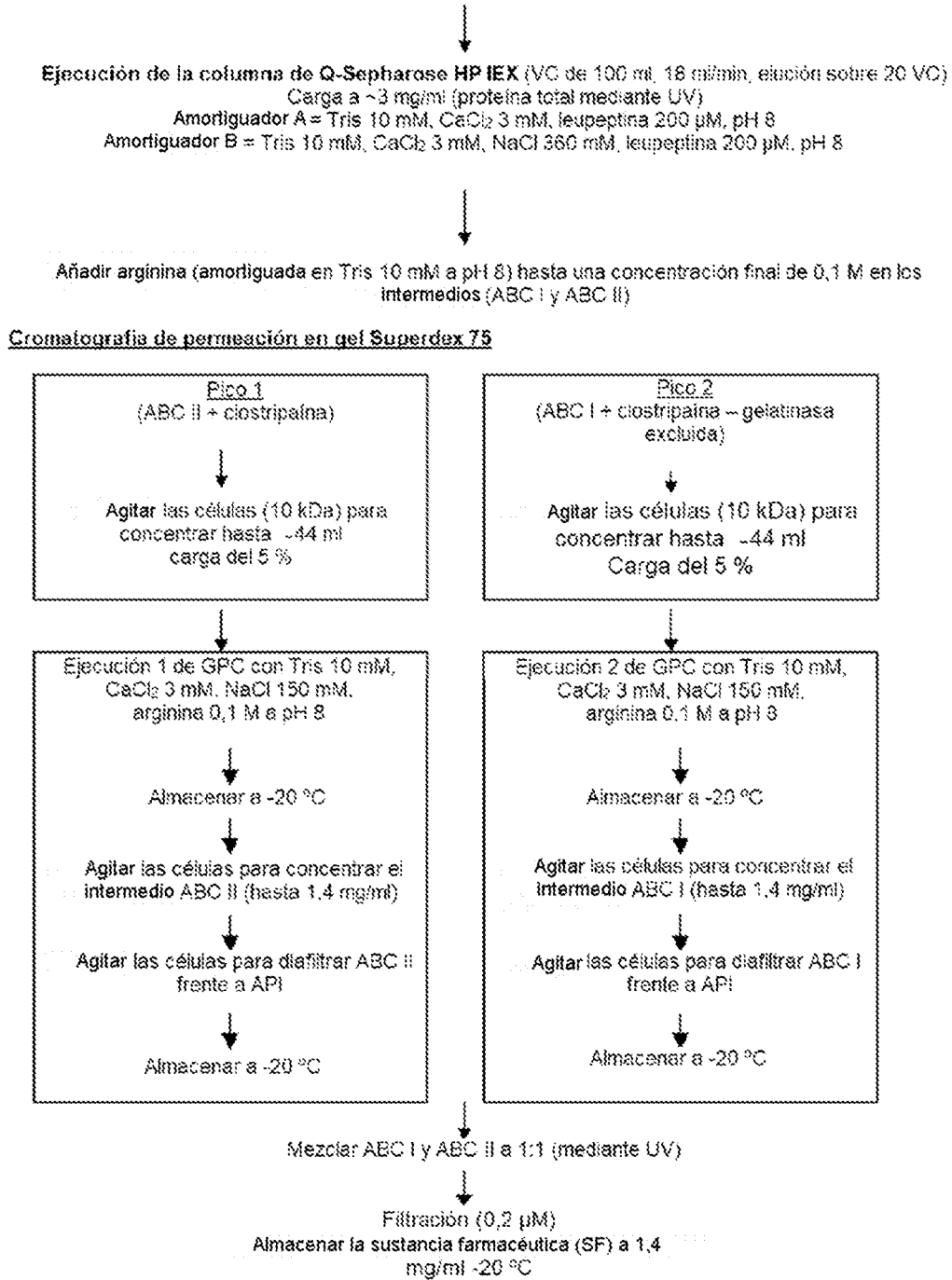


FIG. 45 cont.

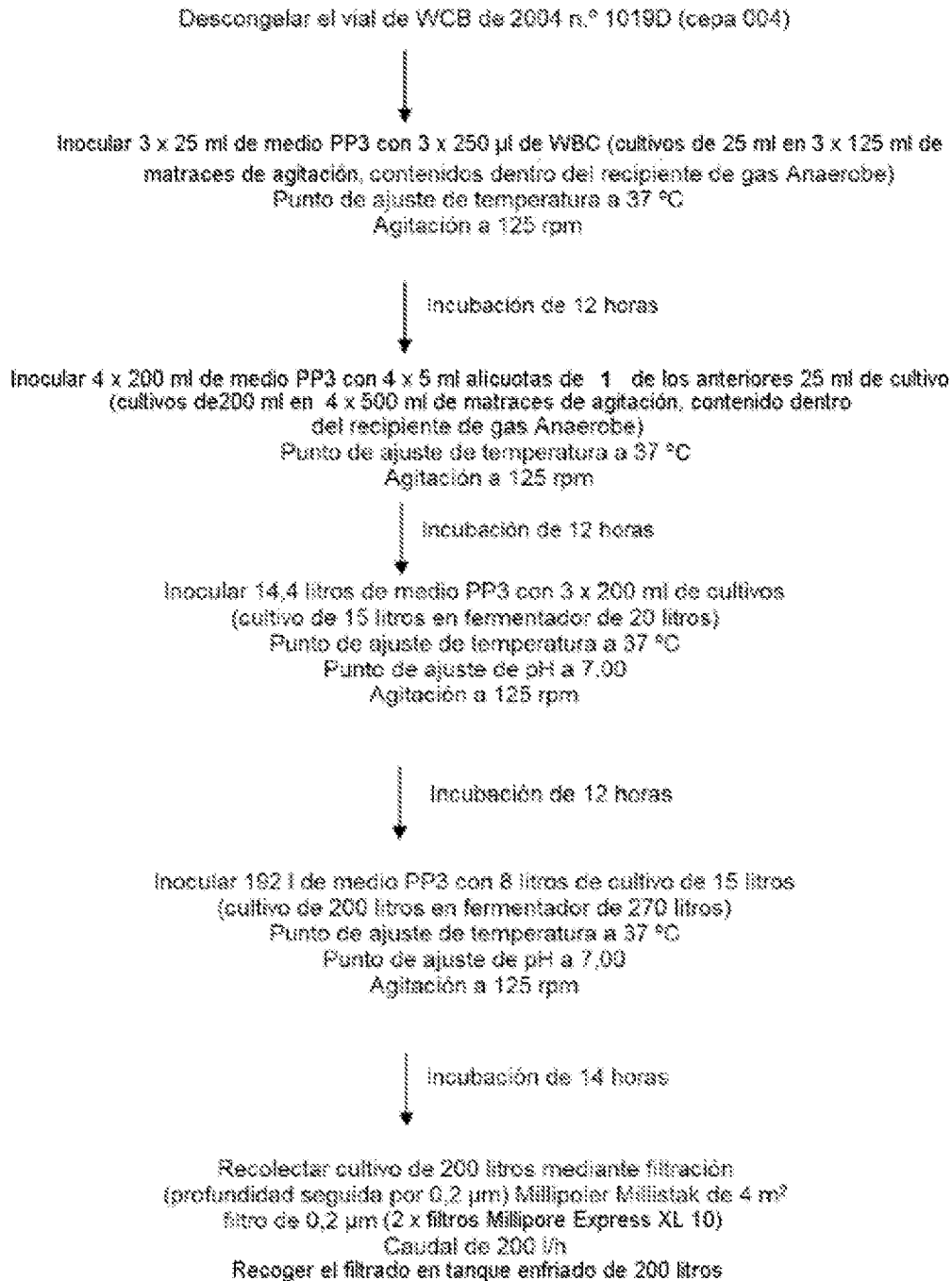


FIG. 46

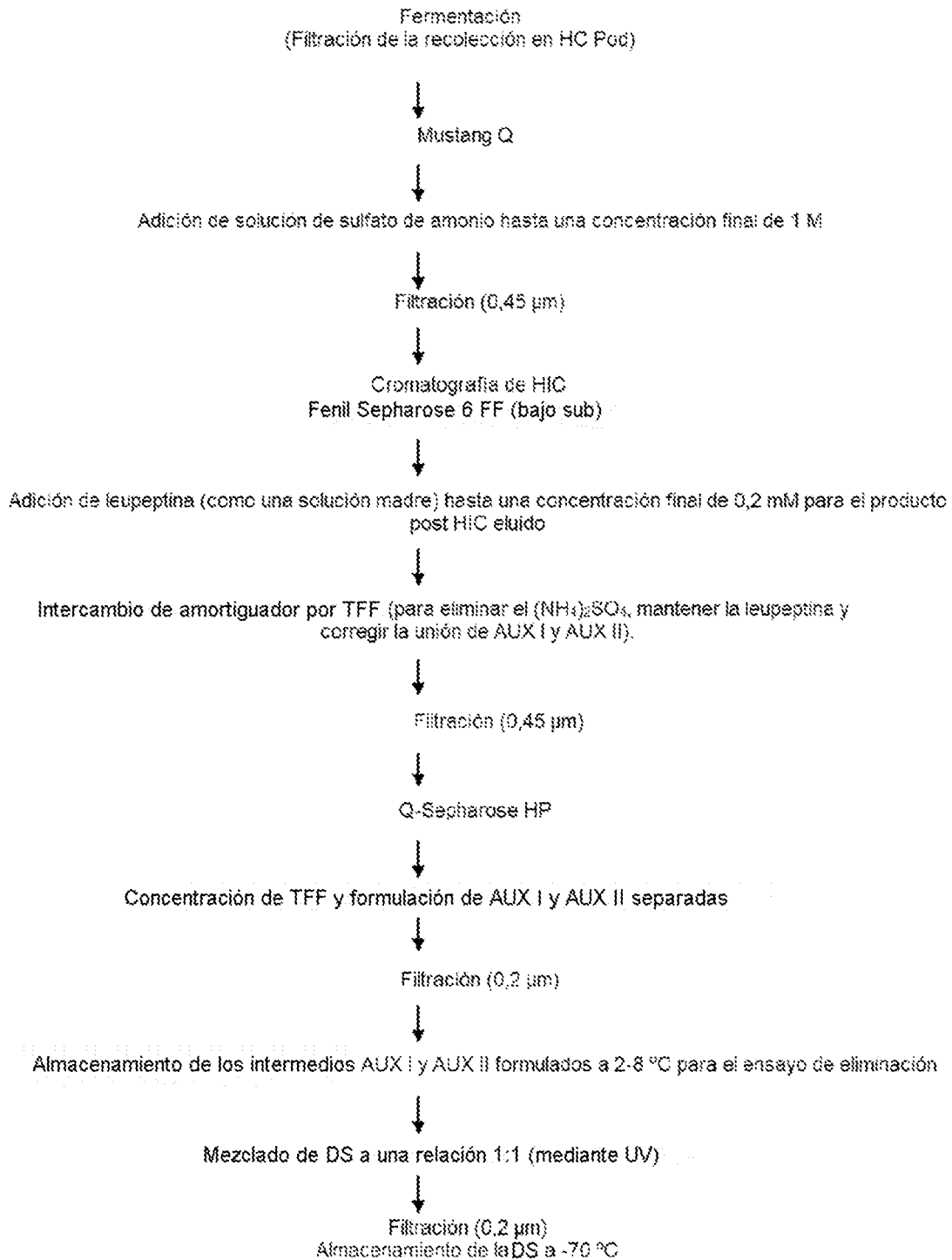


FIG. 47

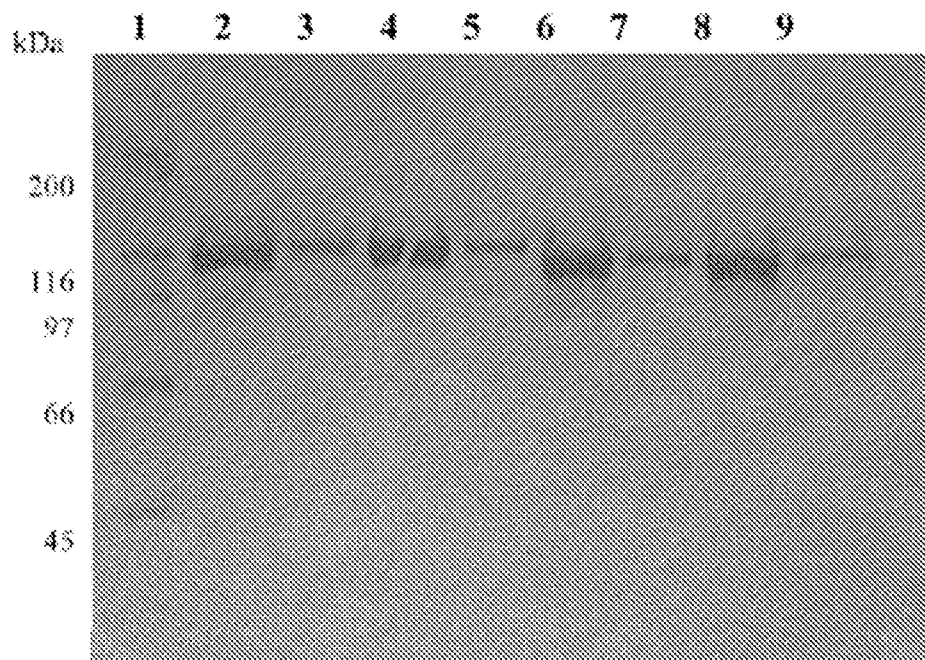


FIG. 48

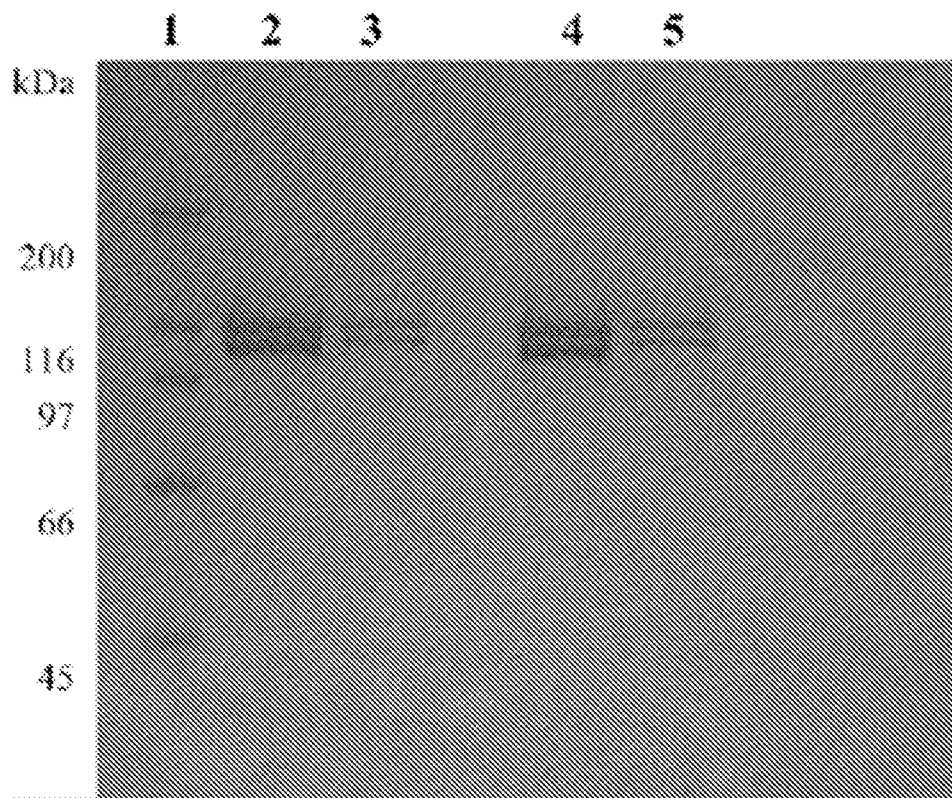


FIG. 49

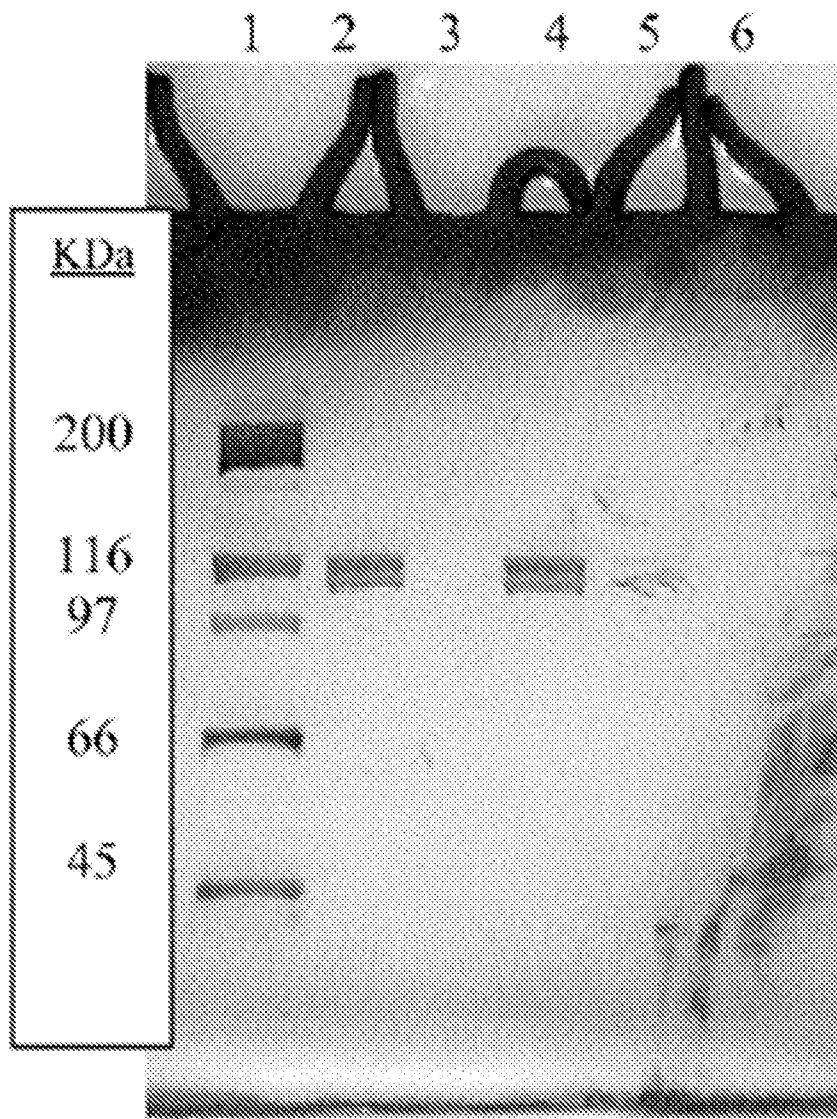


FIG. 50

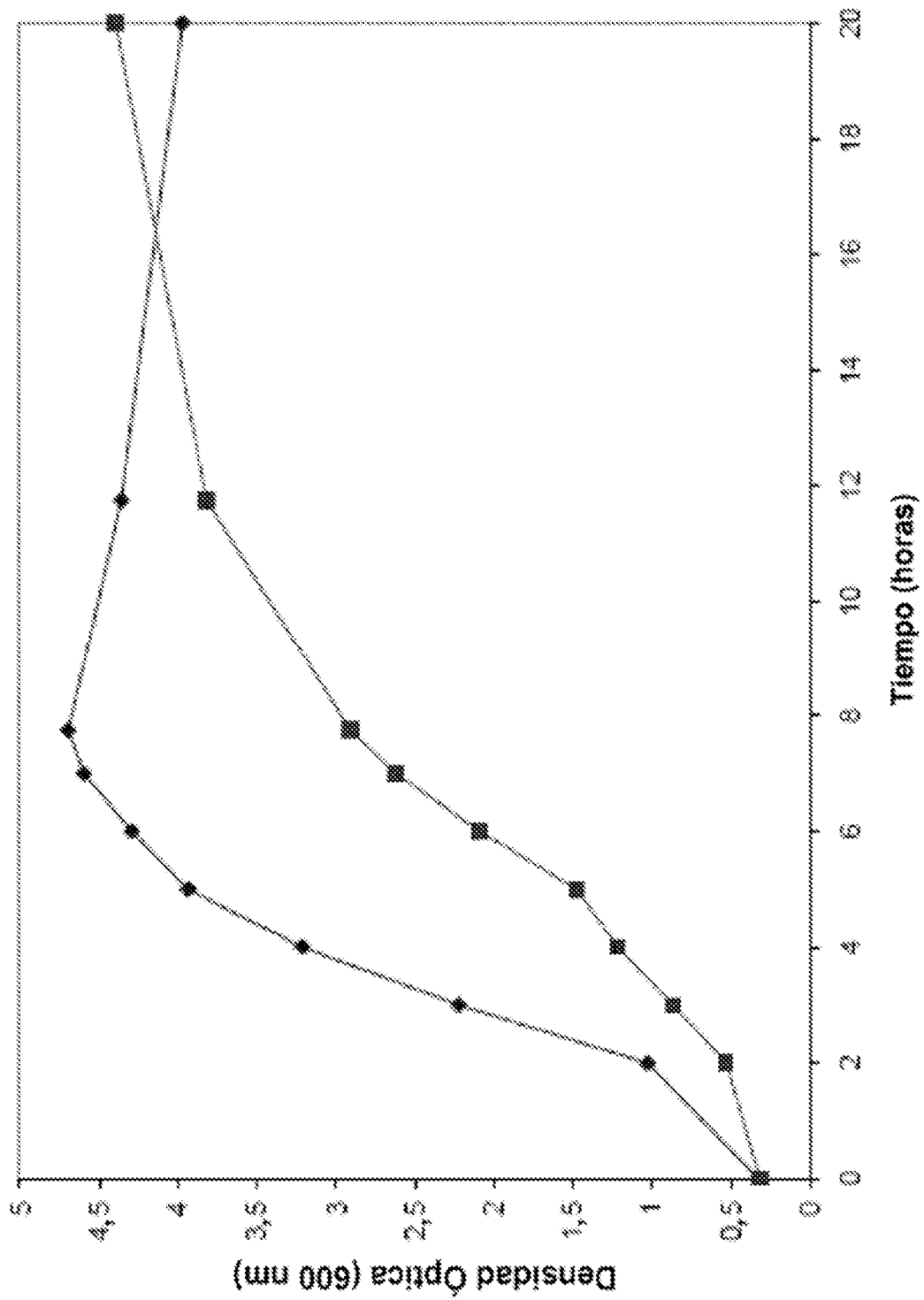


FIG. 51

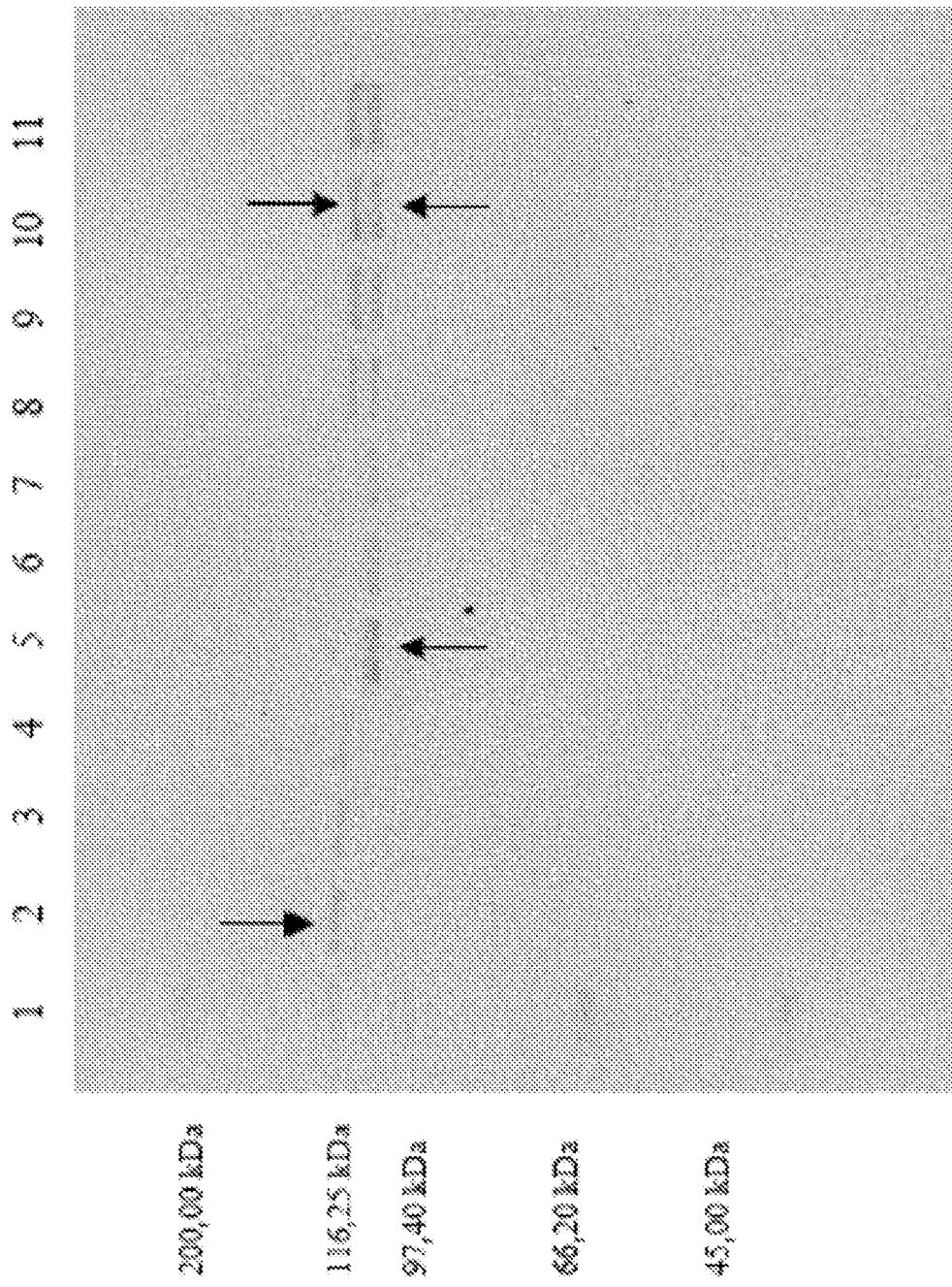


FIG. 52

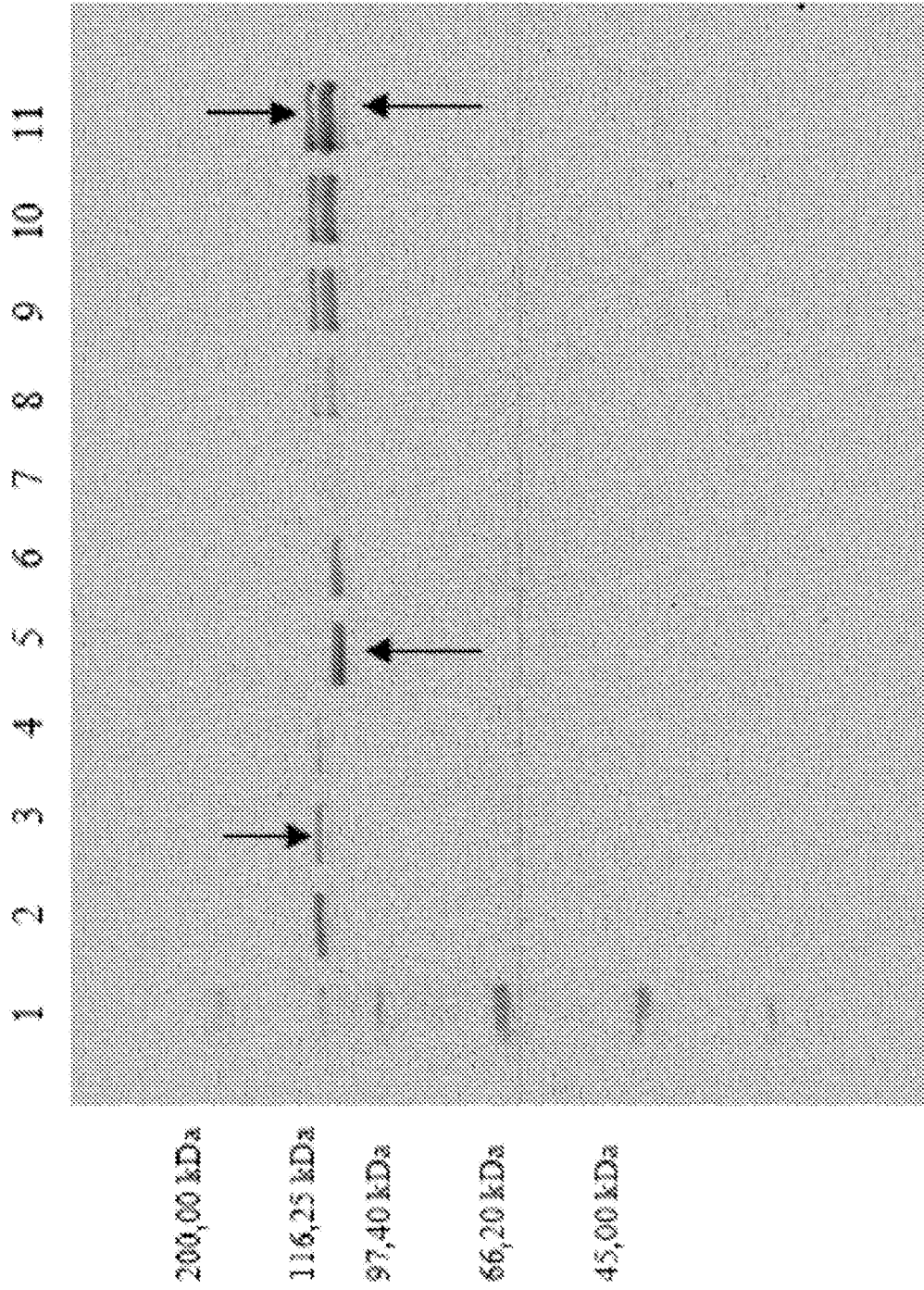


FIG. 53

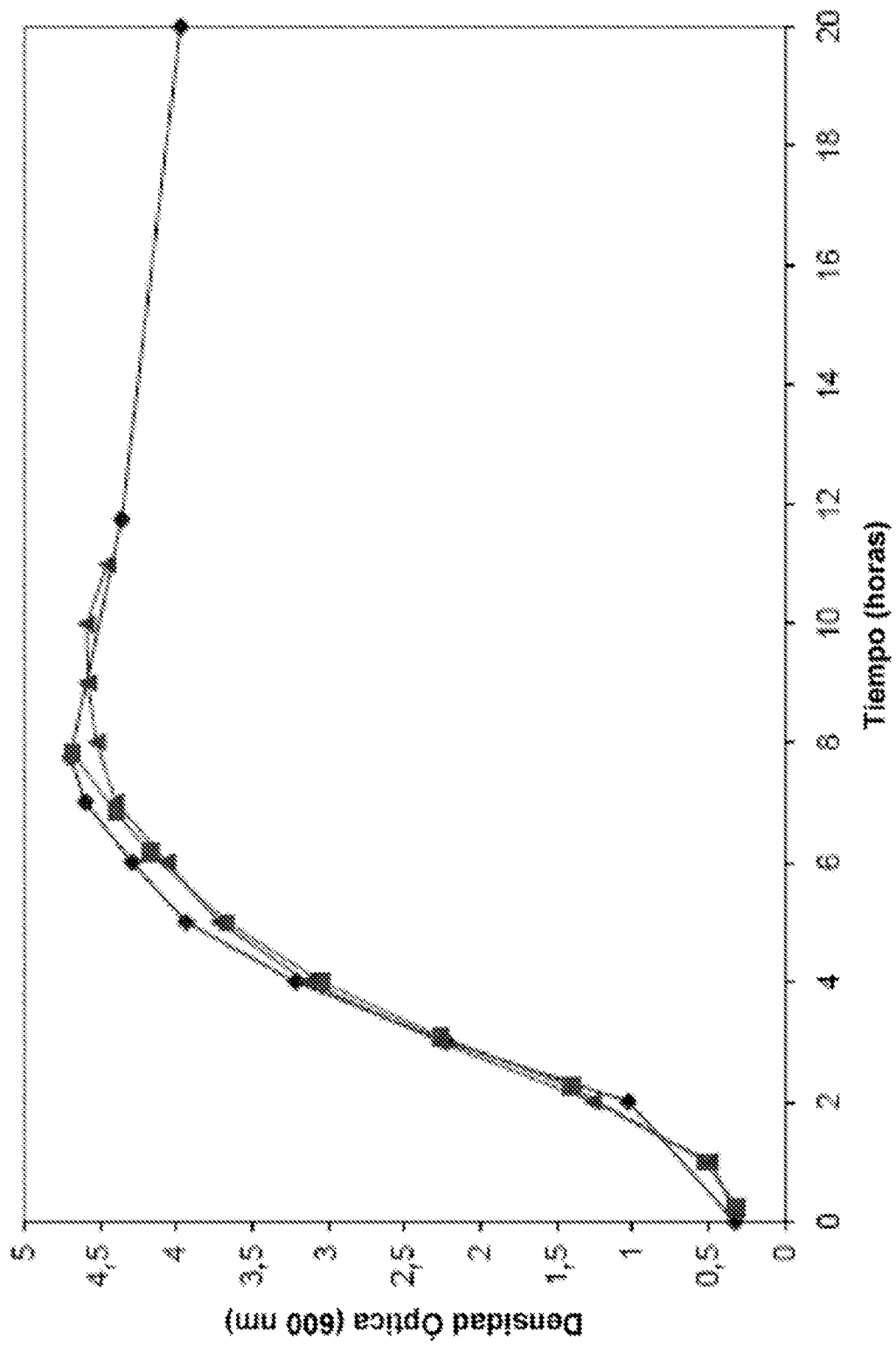


FIG. 54

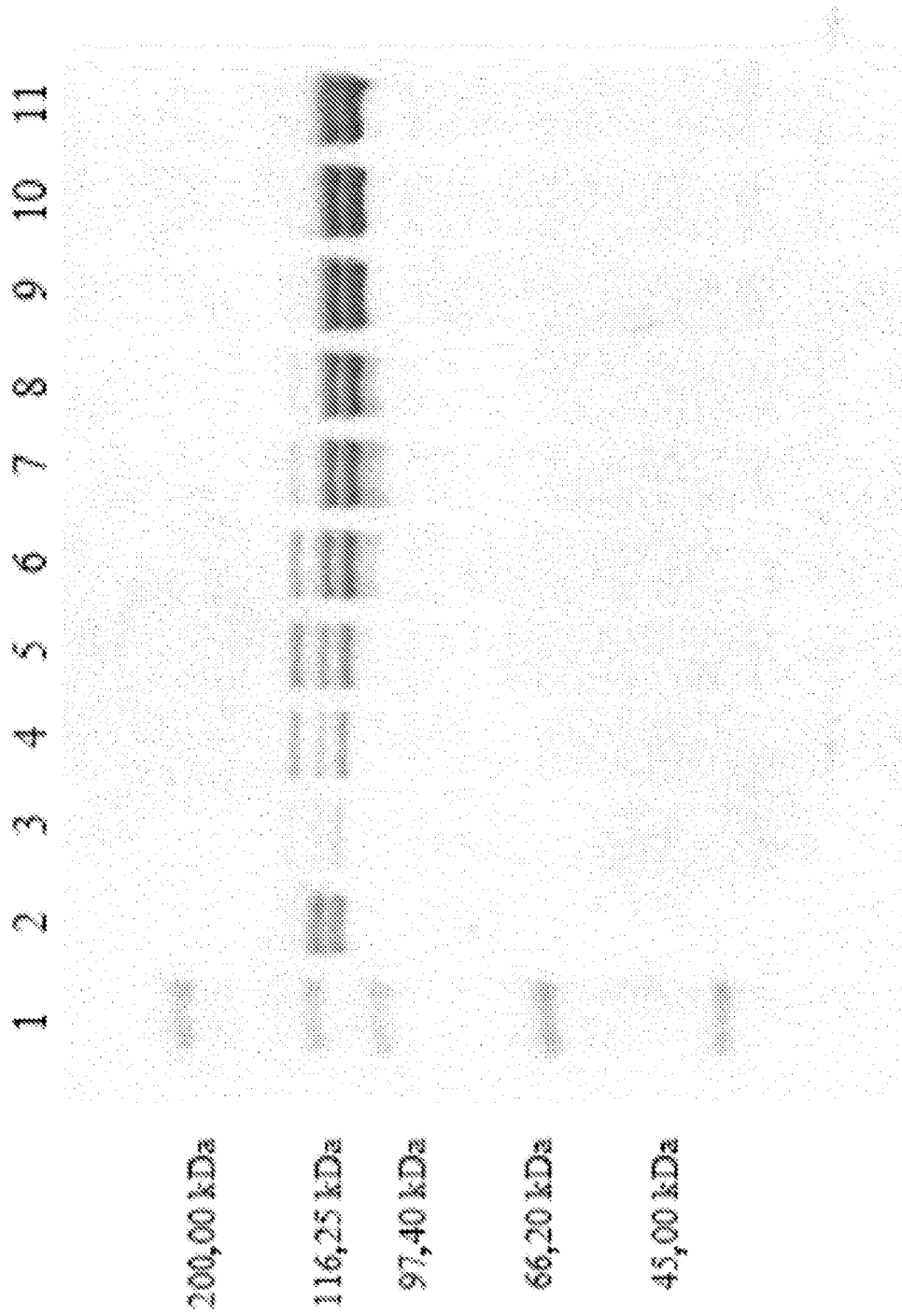


FIG. 55

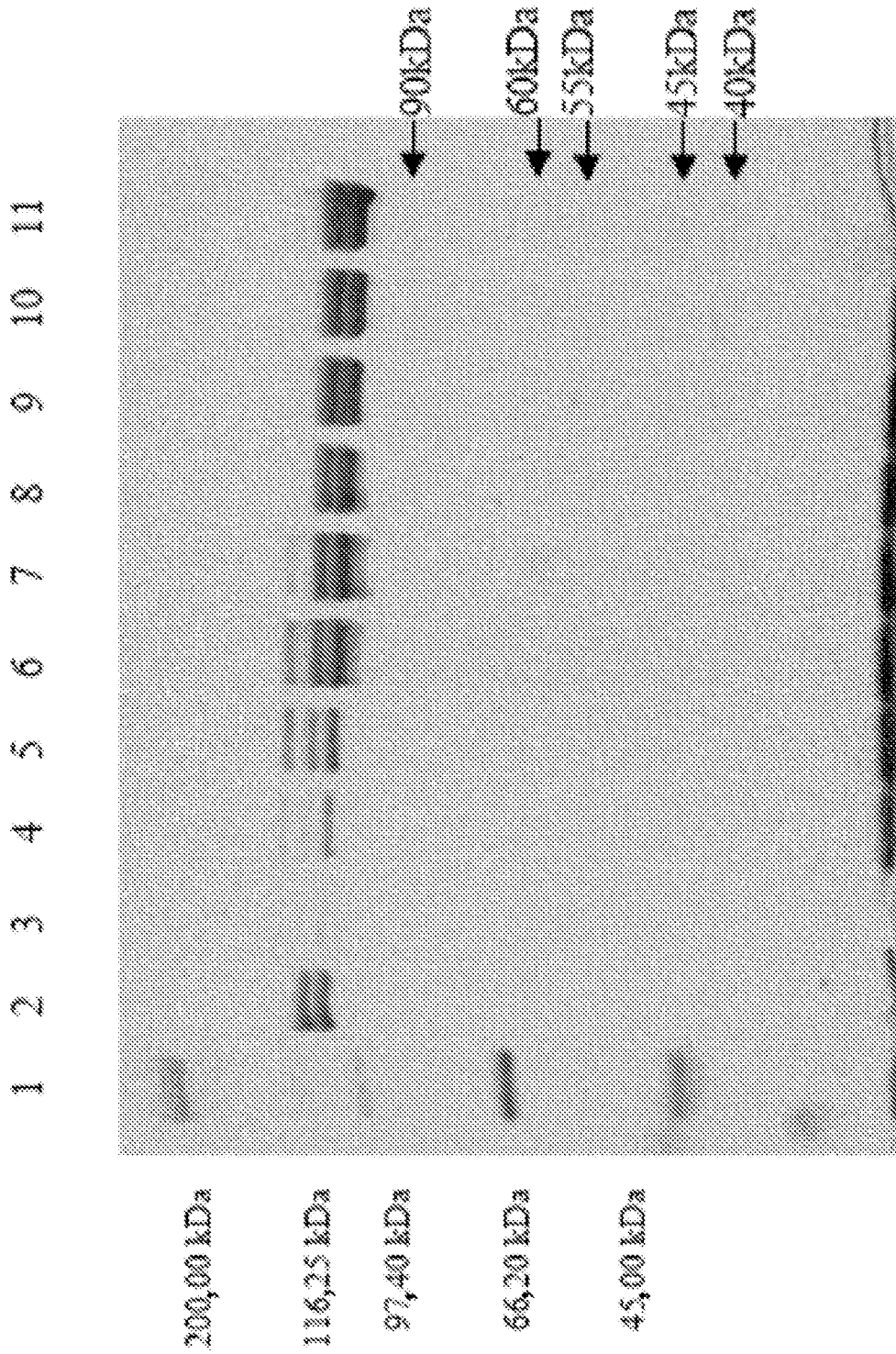


FIG. 56

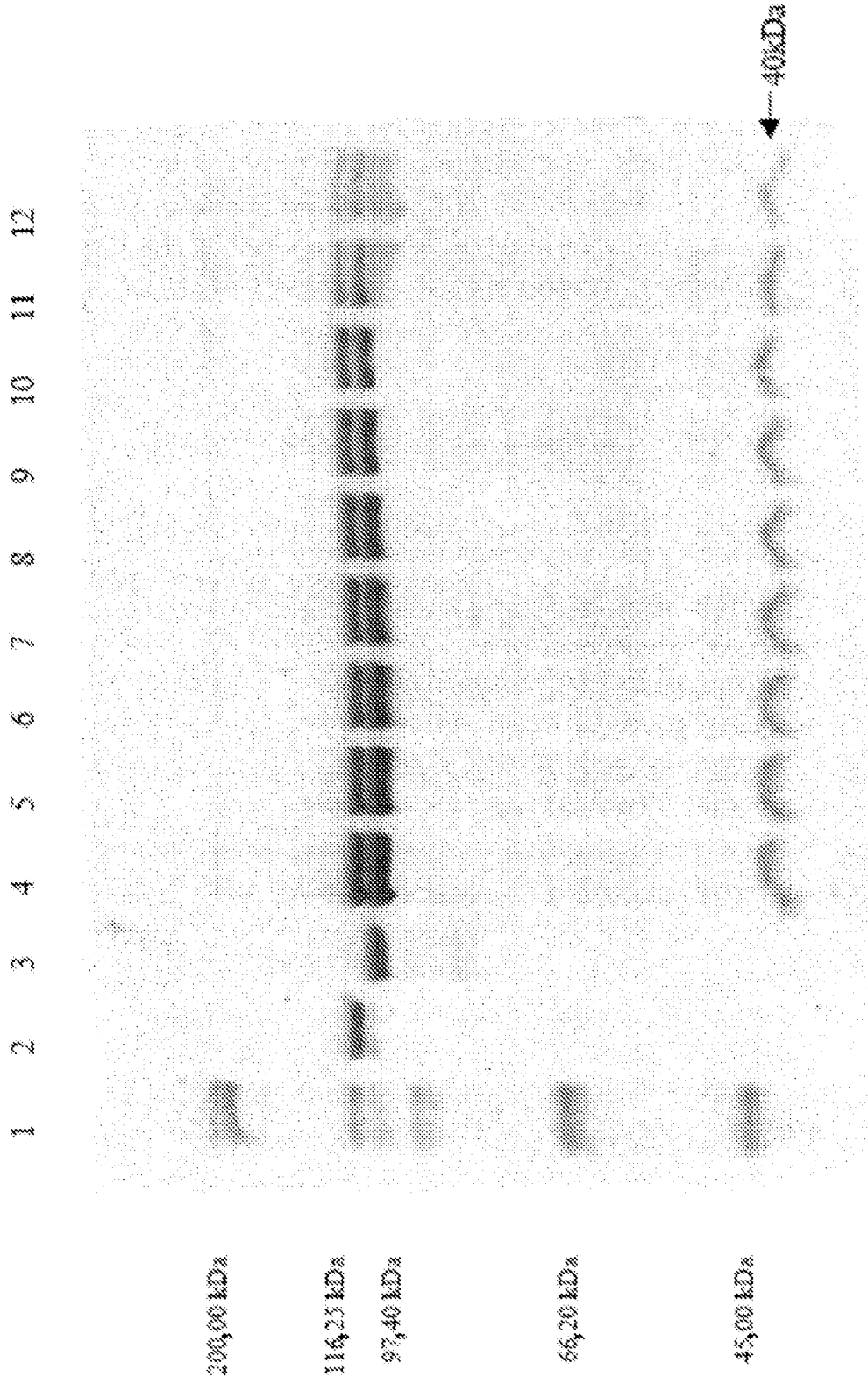


FIG. 57

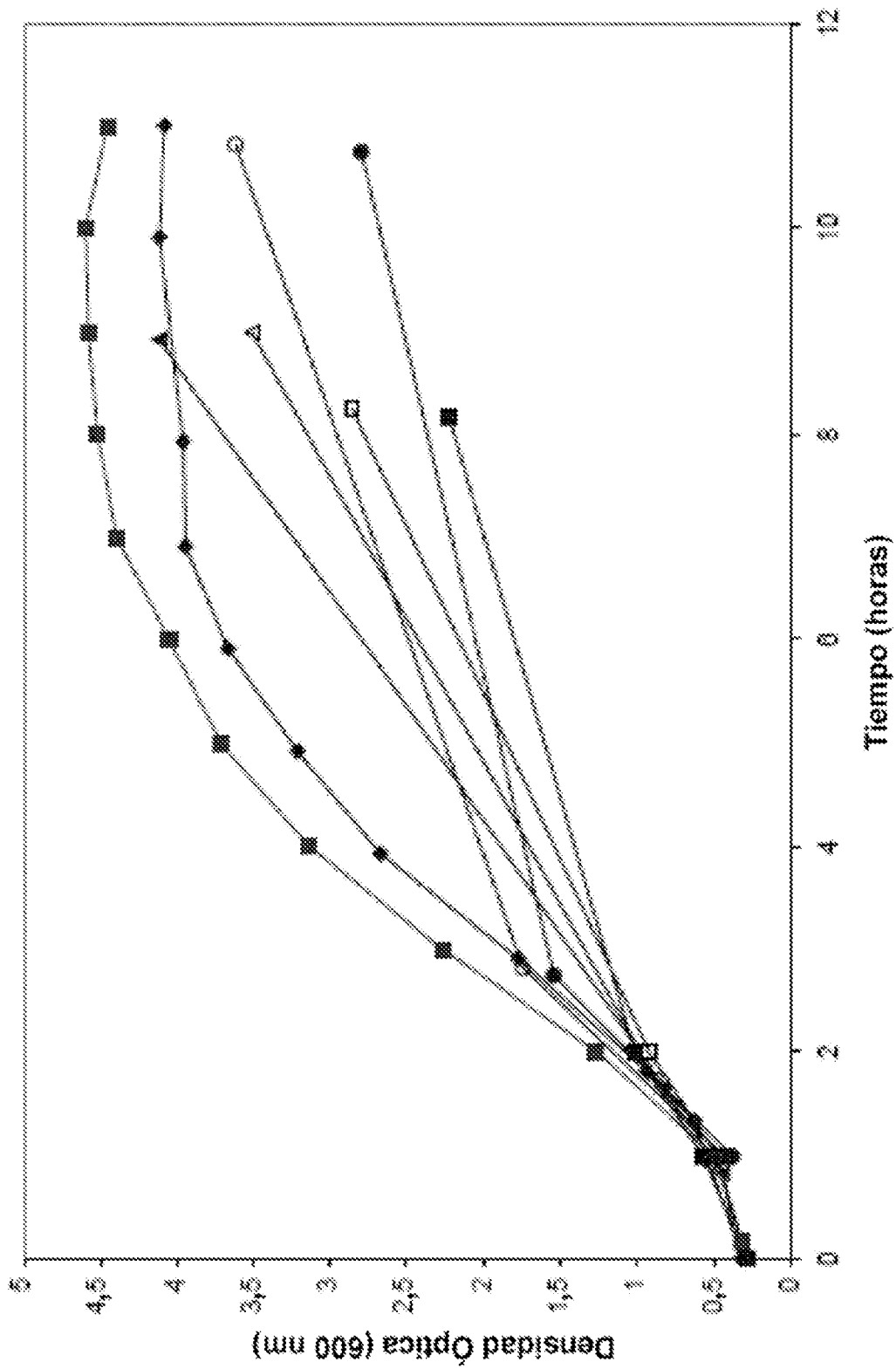


FIG. 58

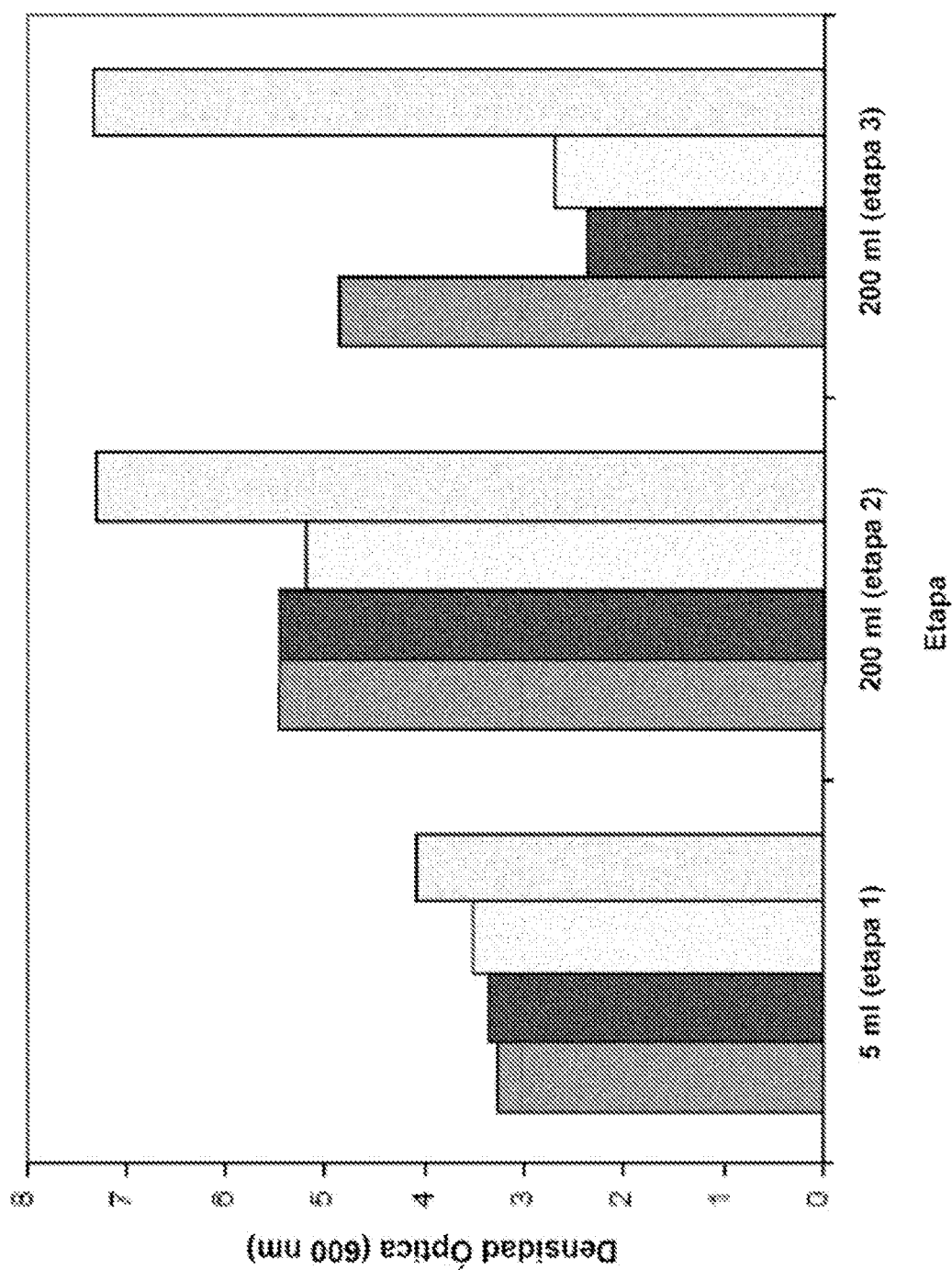


FIG. 59

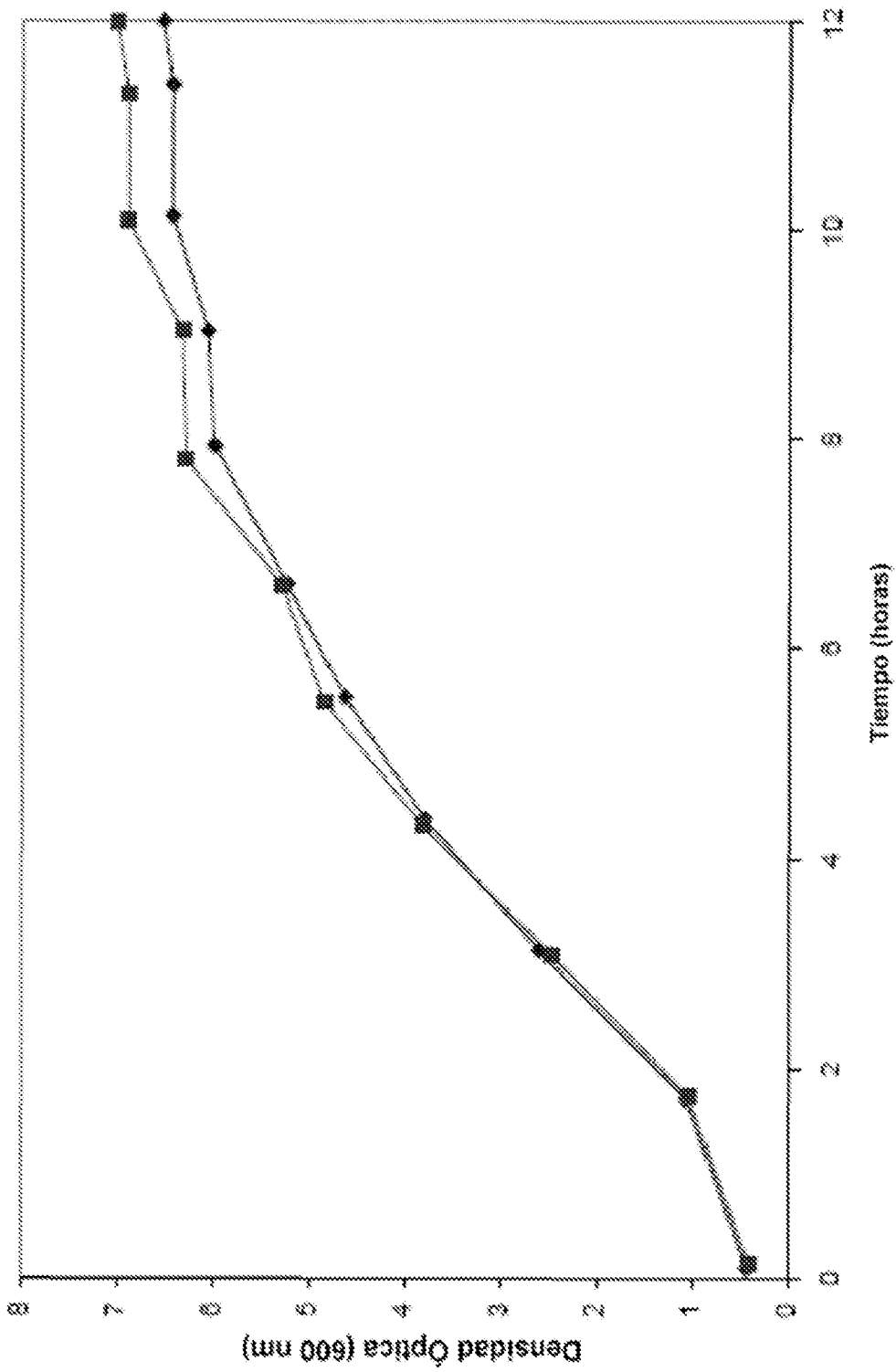


FIG. 60

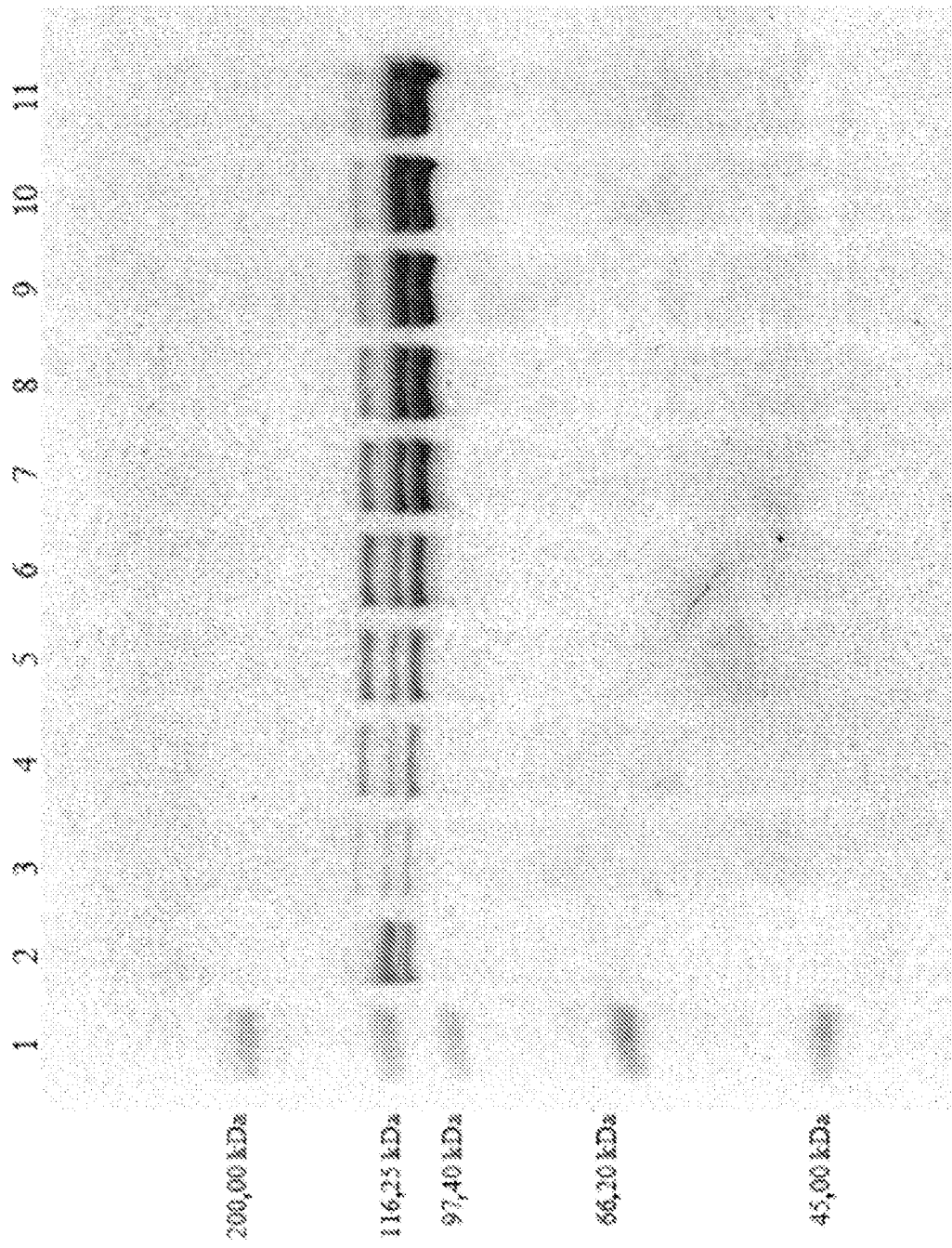


FIG. 61

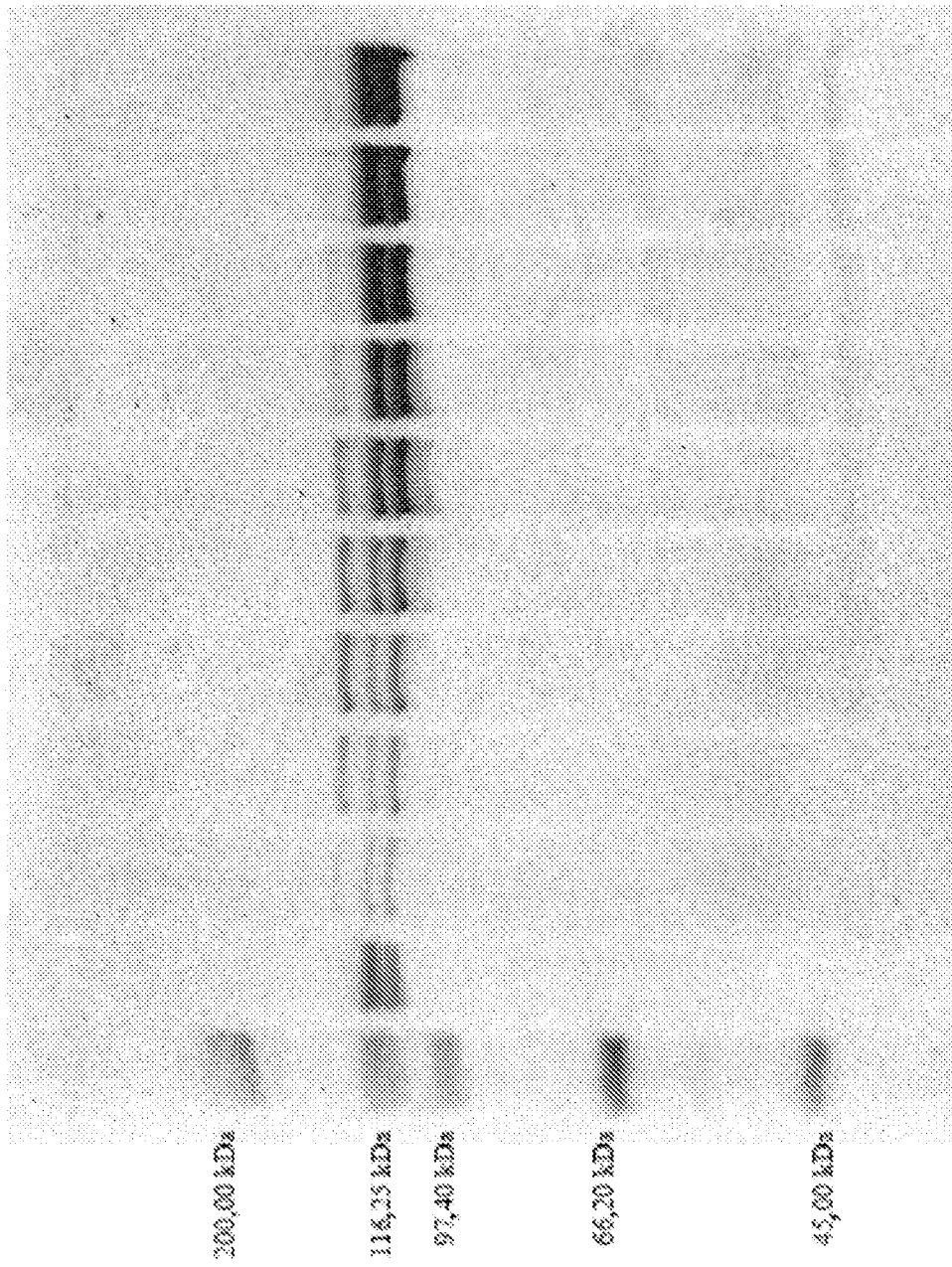


FIG. 62

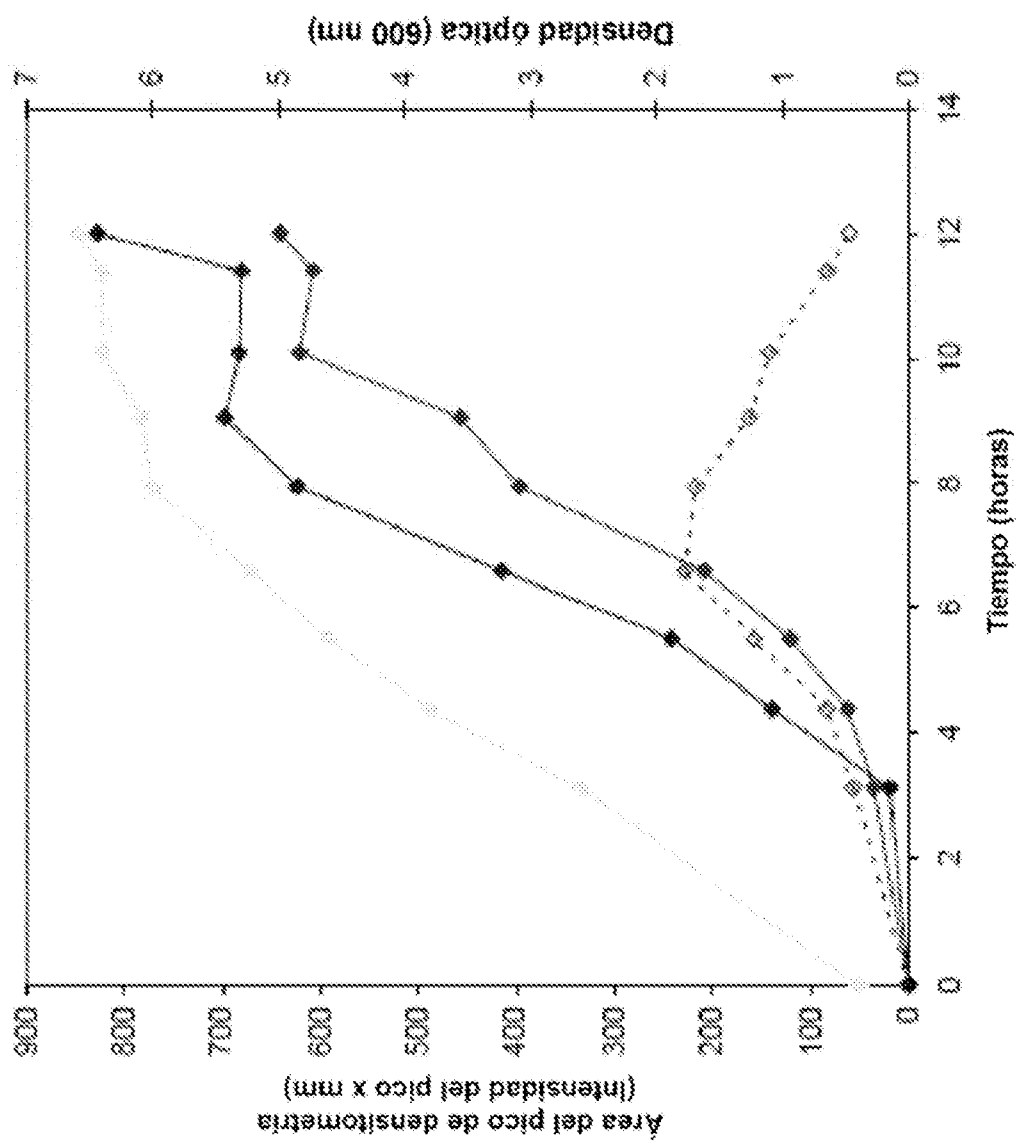


FIG. 63

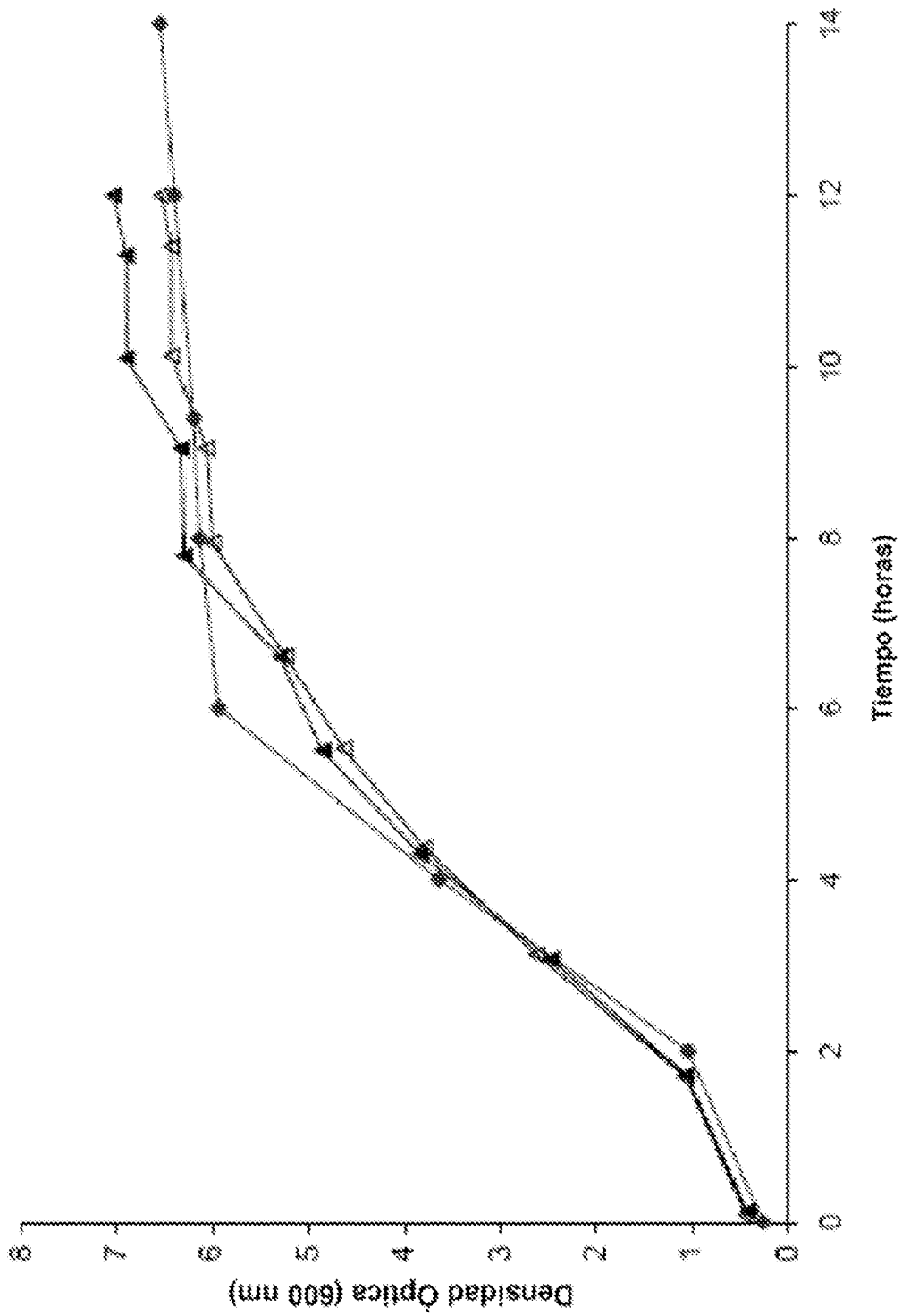


FIG. 64

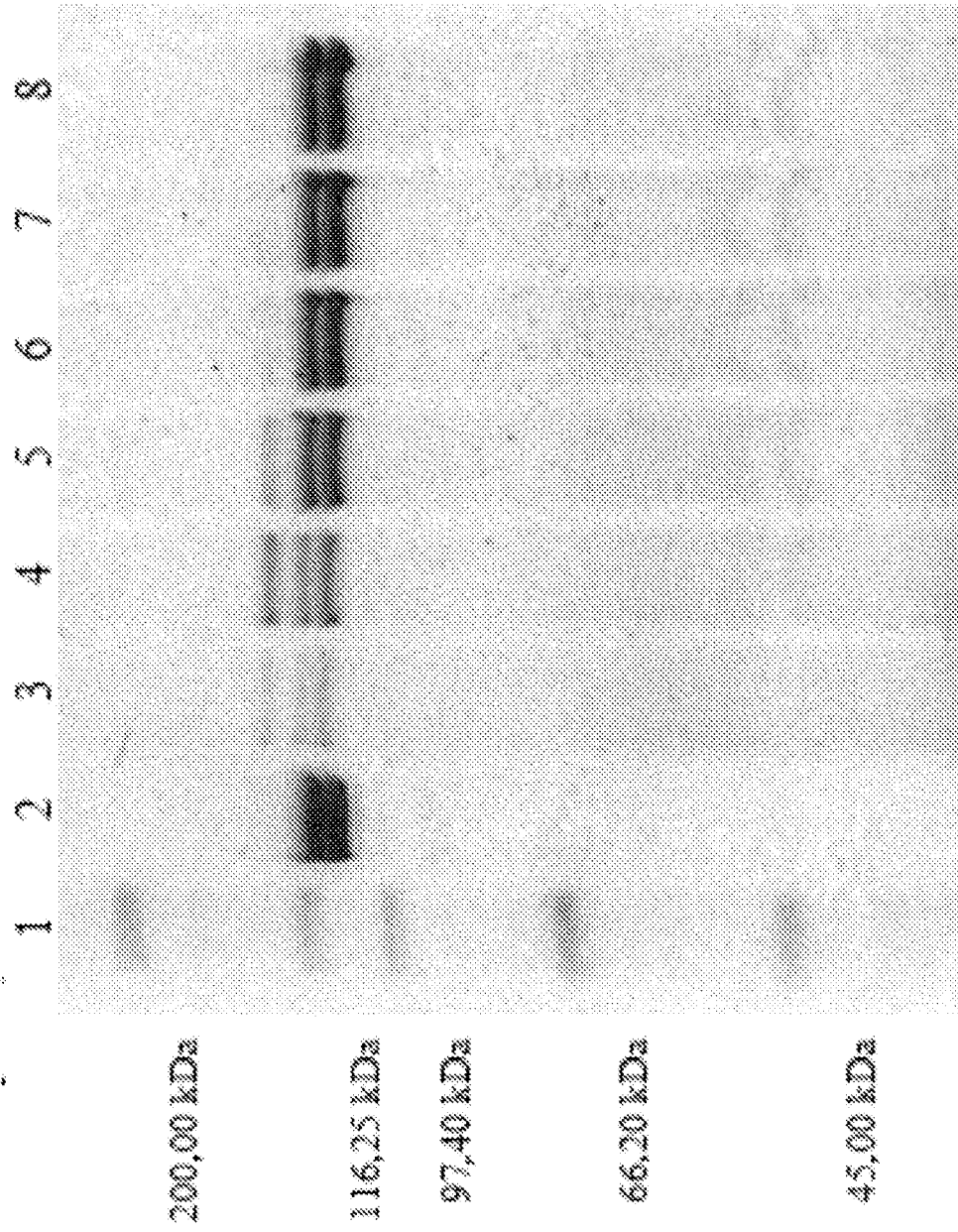


FIG. 65

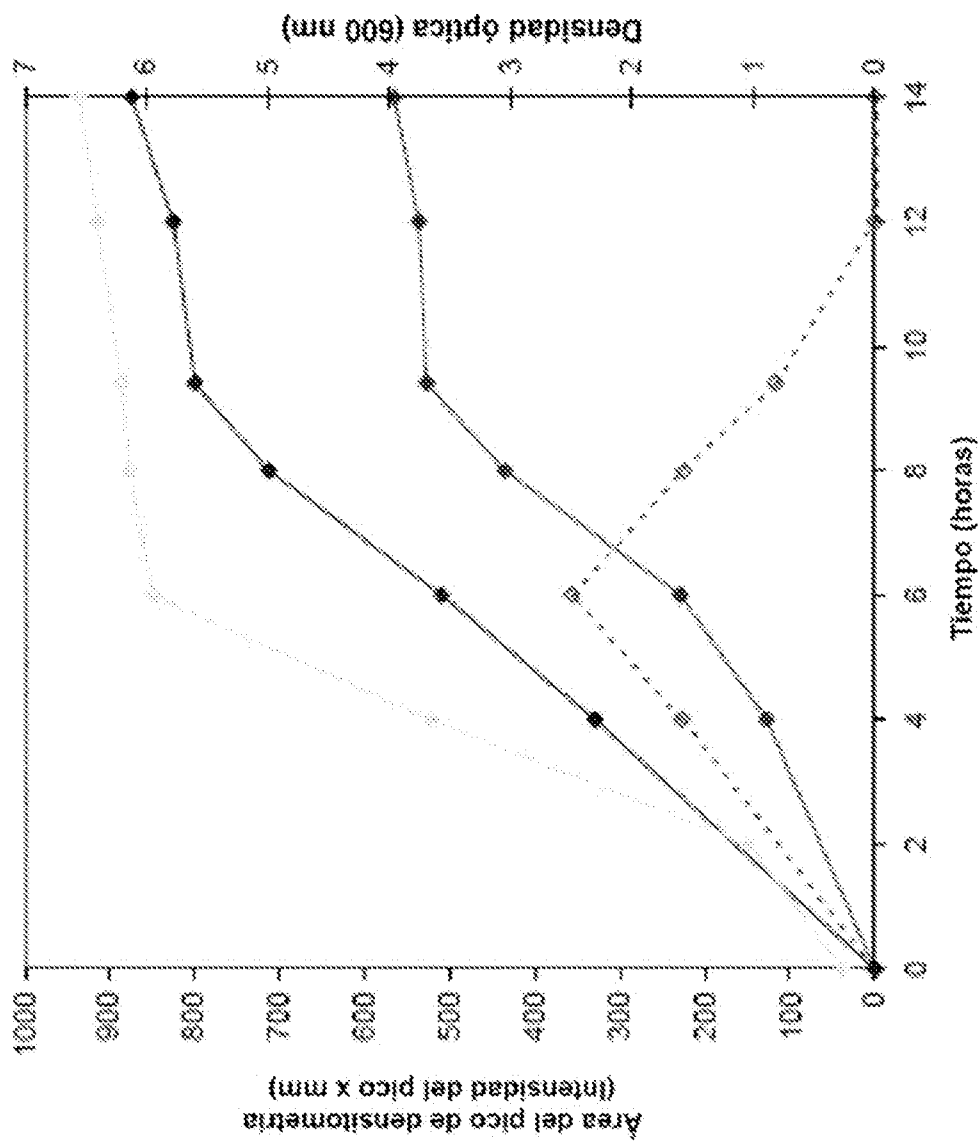


FIG. 66

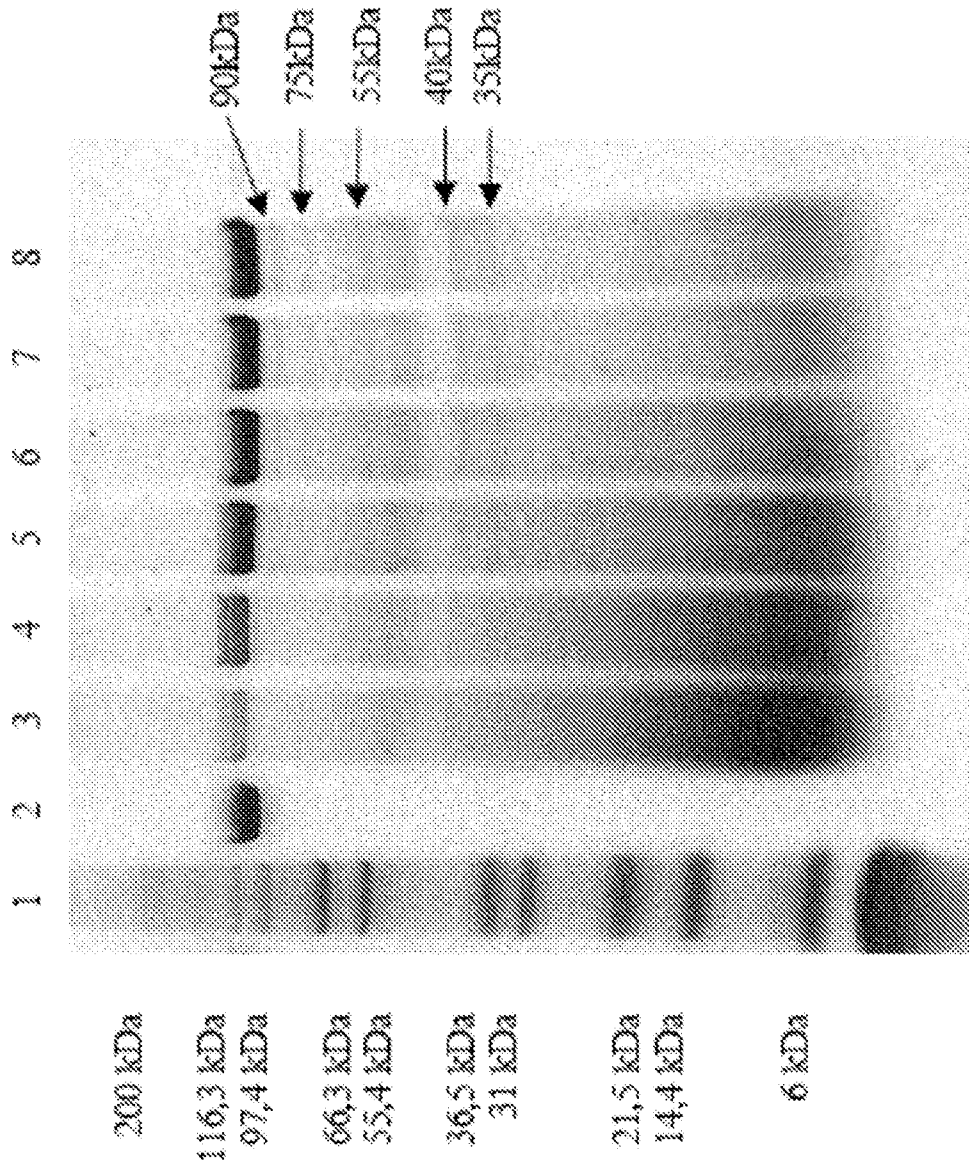


FIG. 67

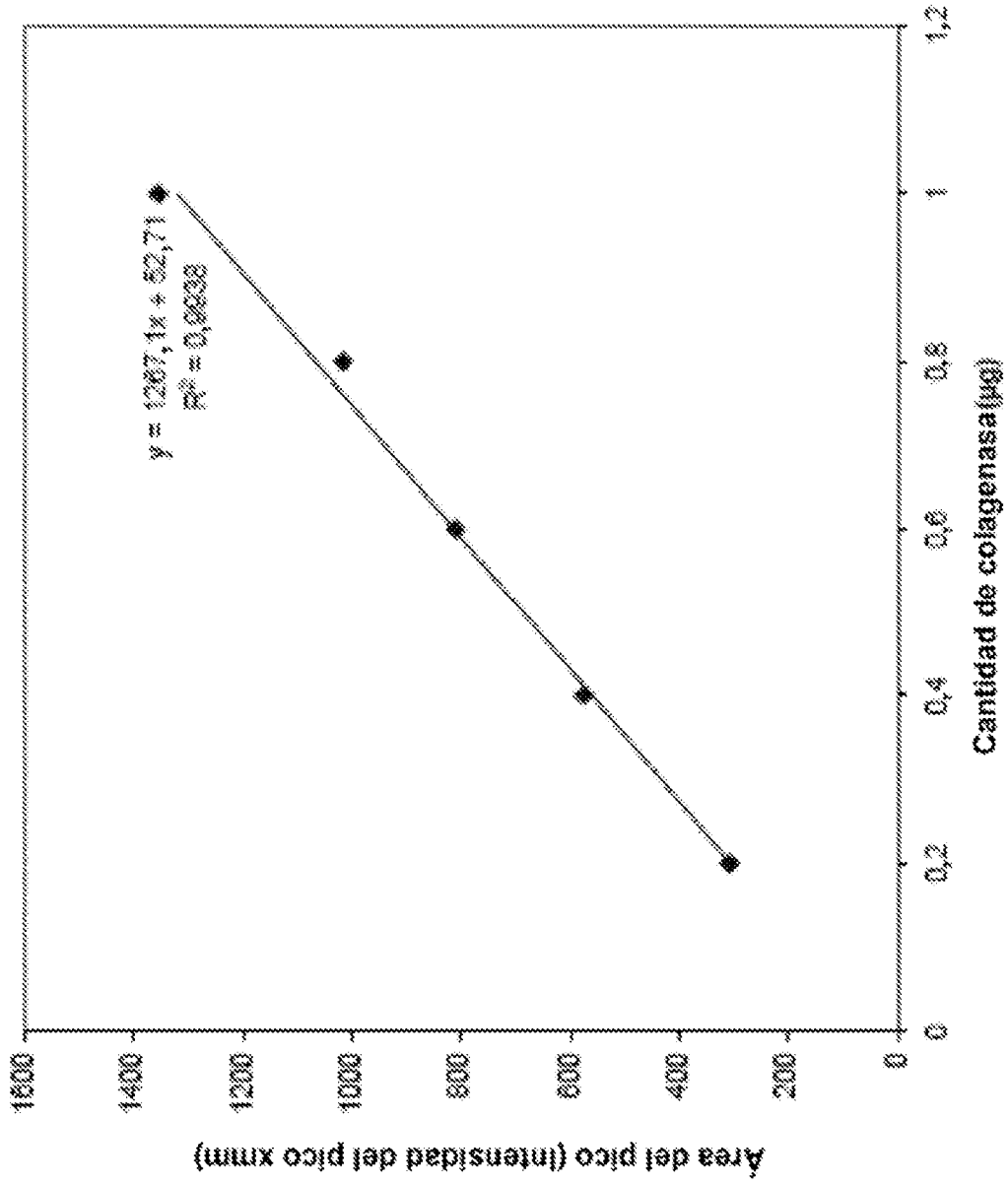


FIG. 68

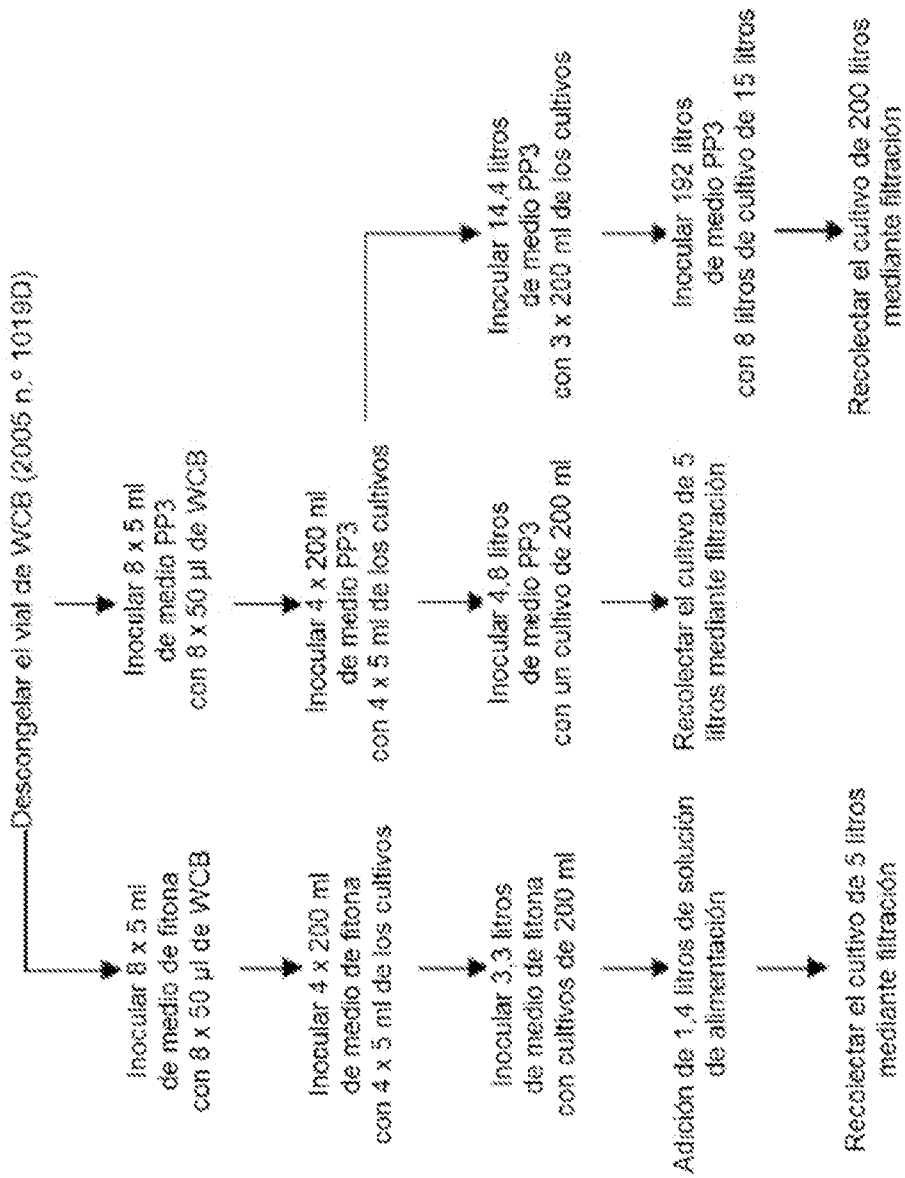


FIG. 69

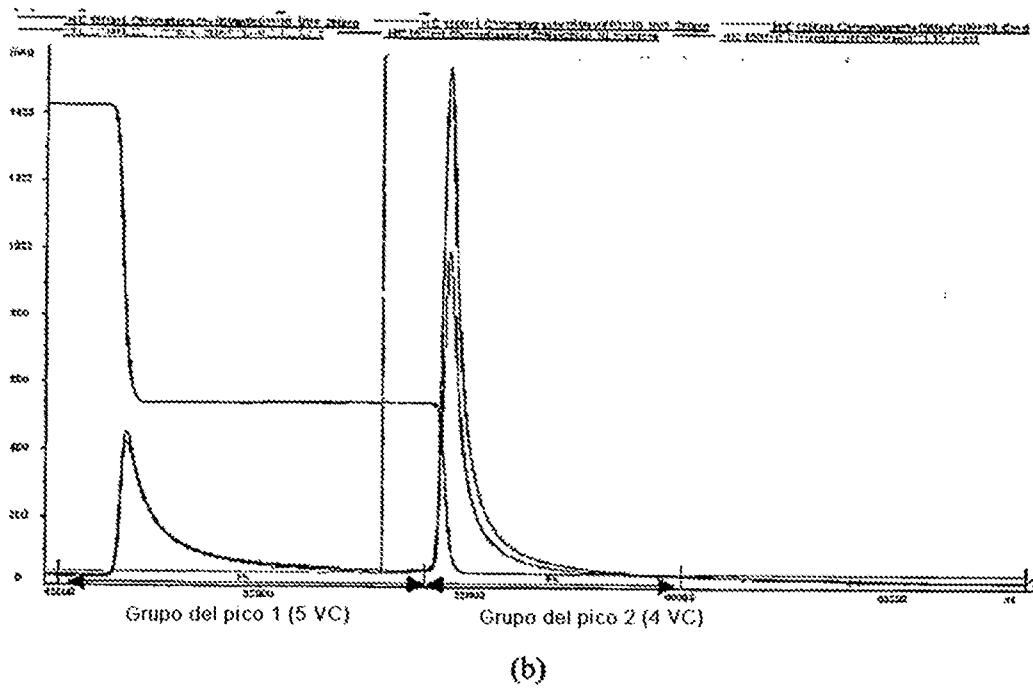
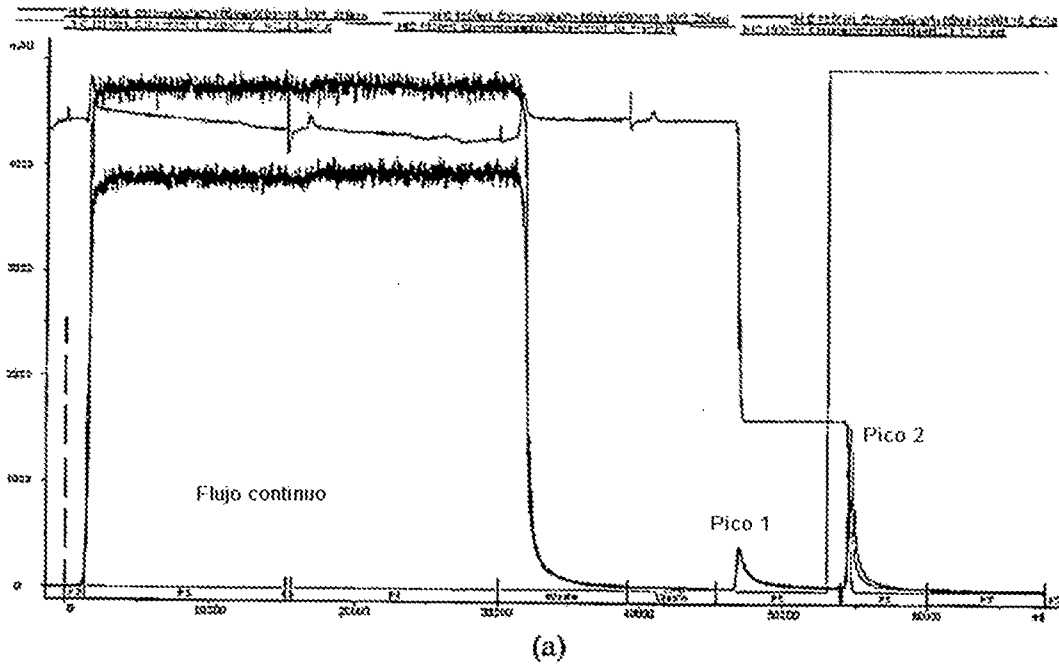


FIG. 70

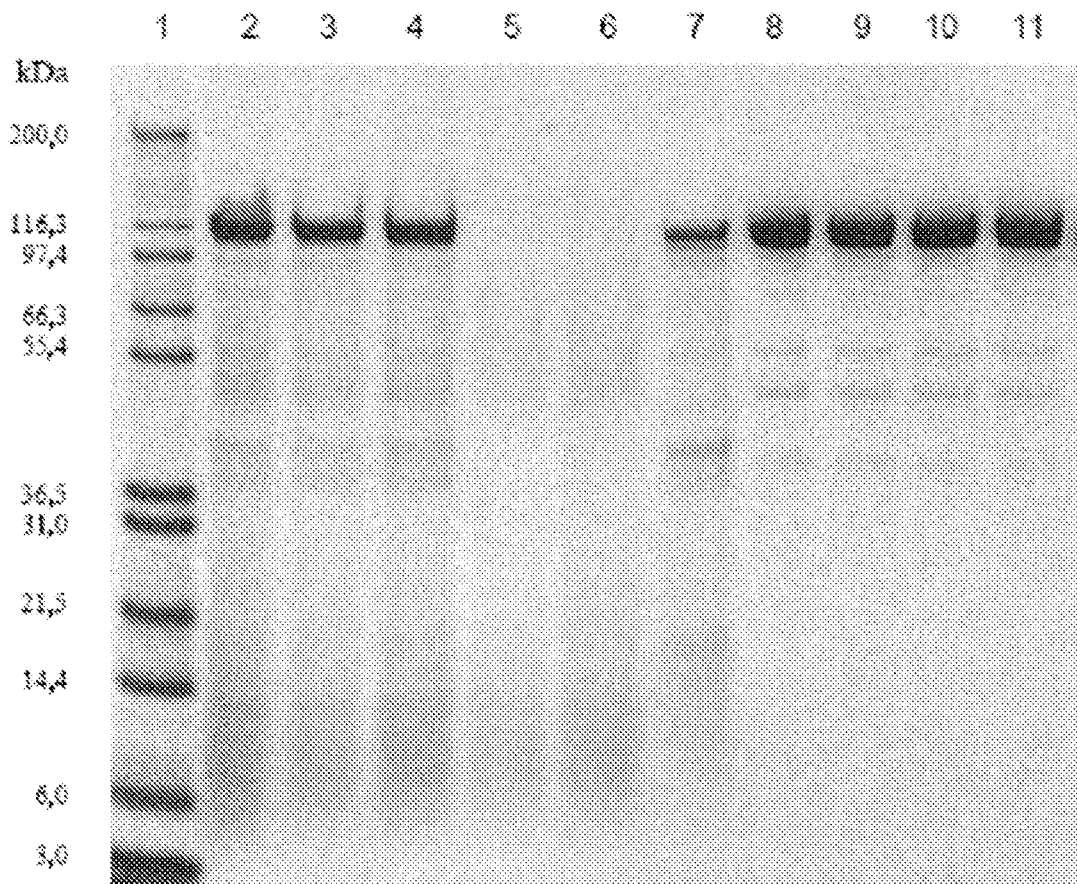


FIG. 71

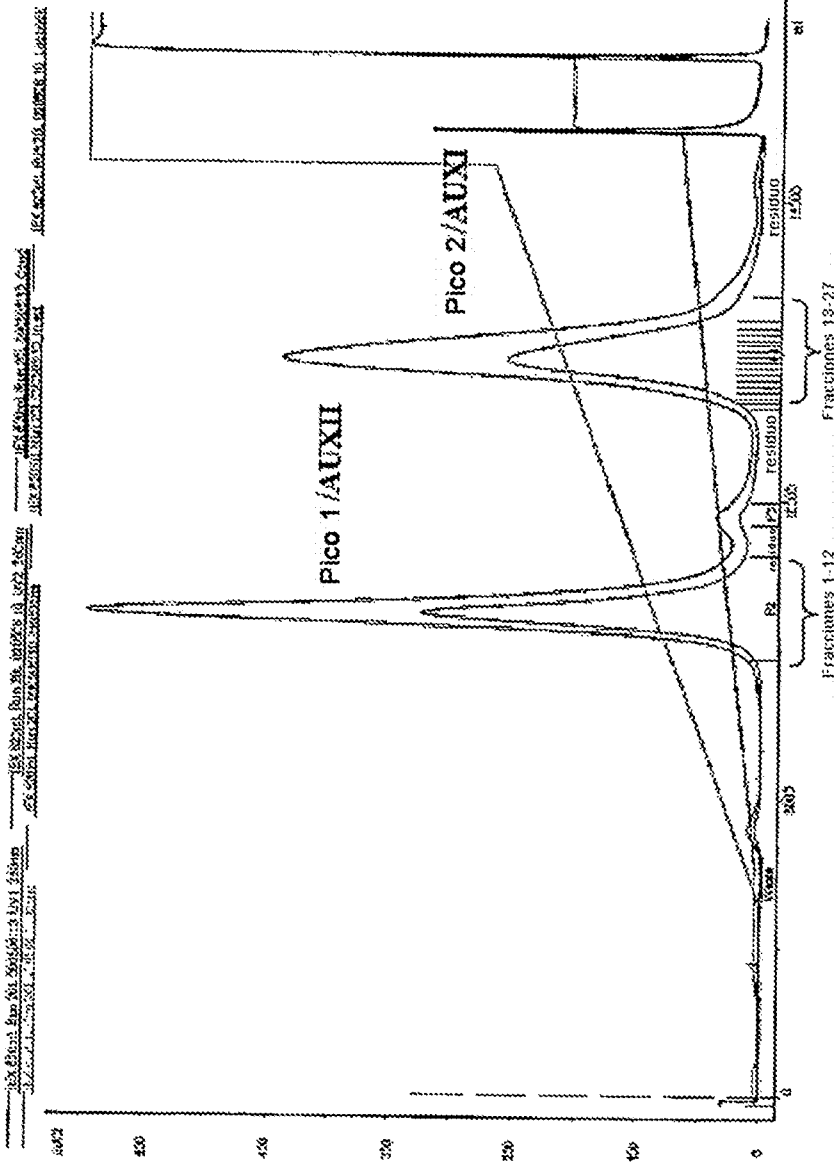


FIG. 72

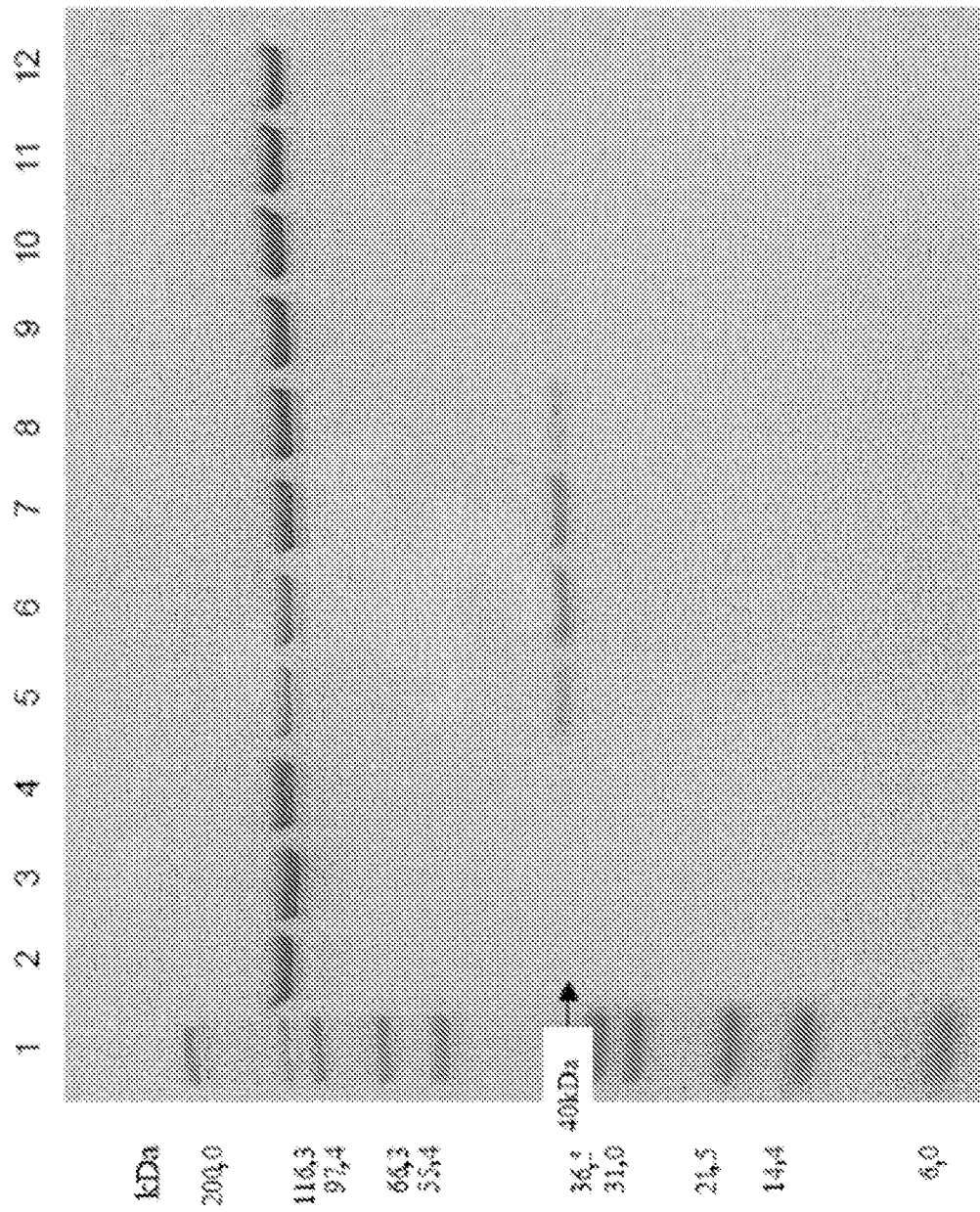


FIG. 73

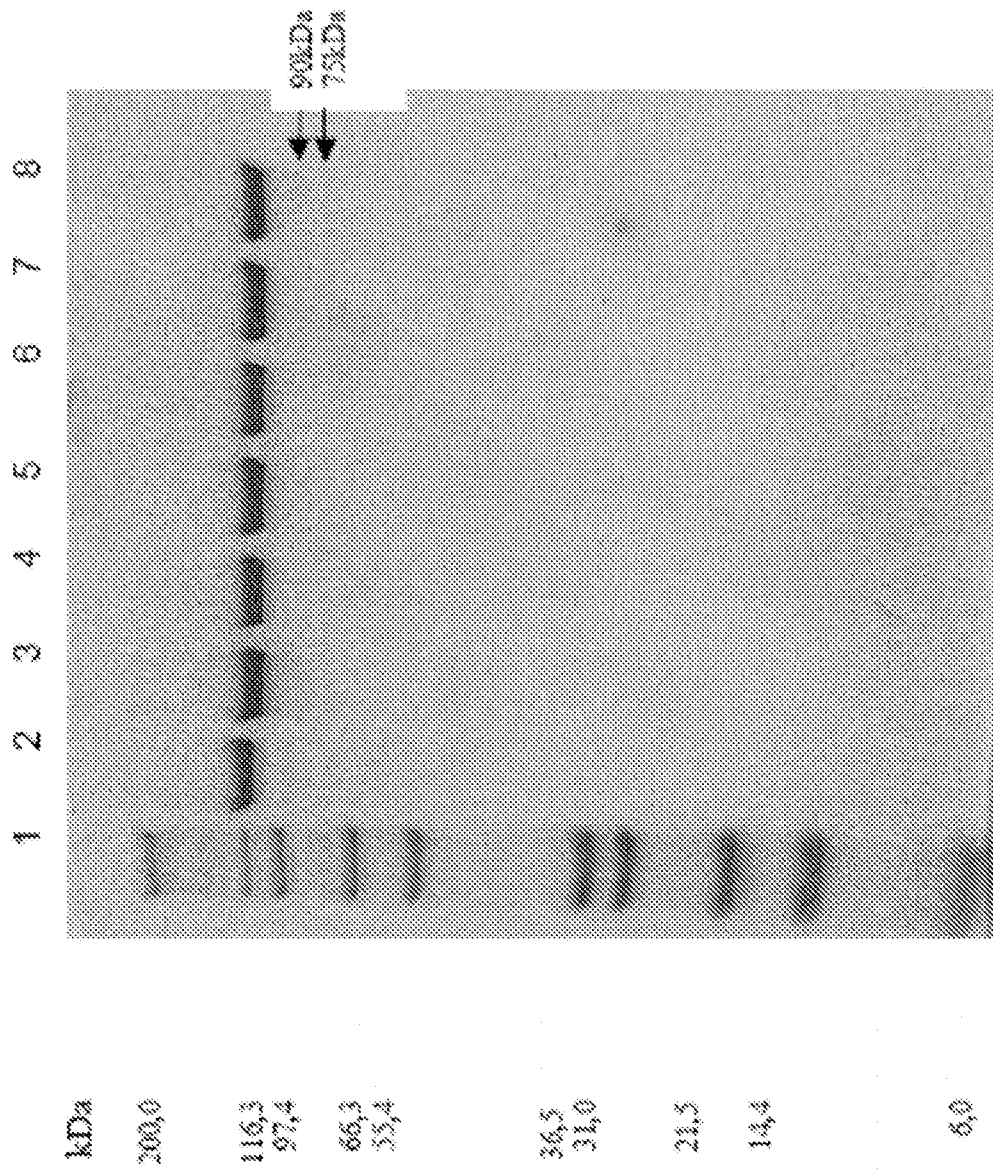


FIG. 74

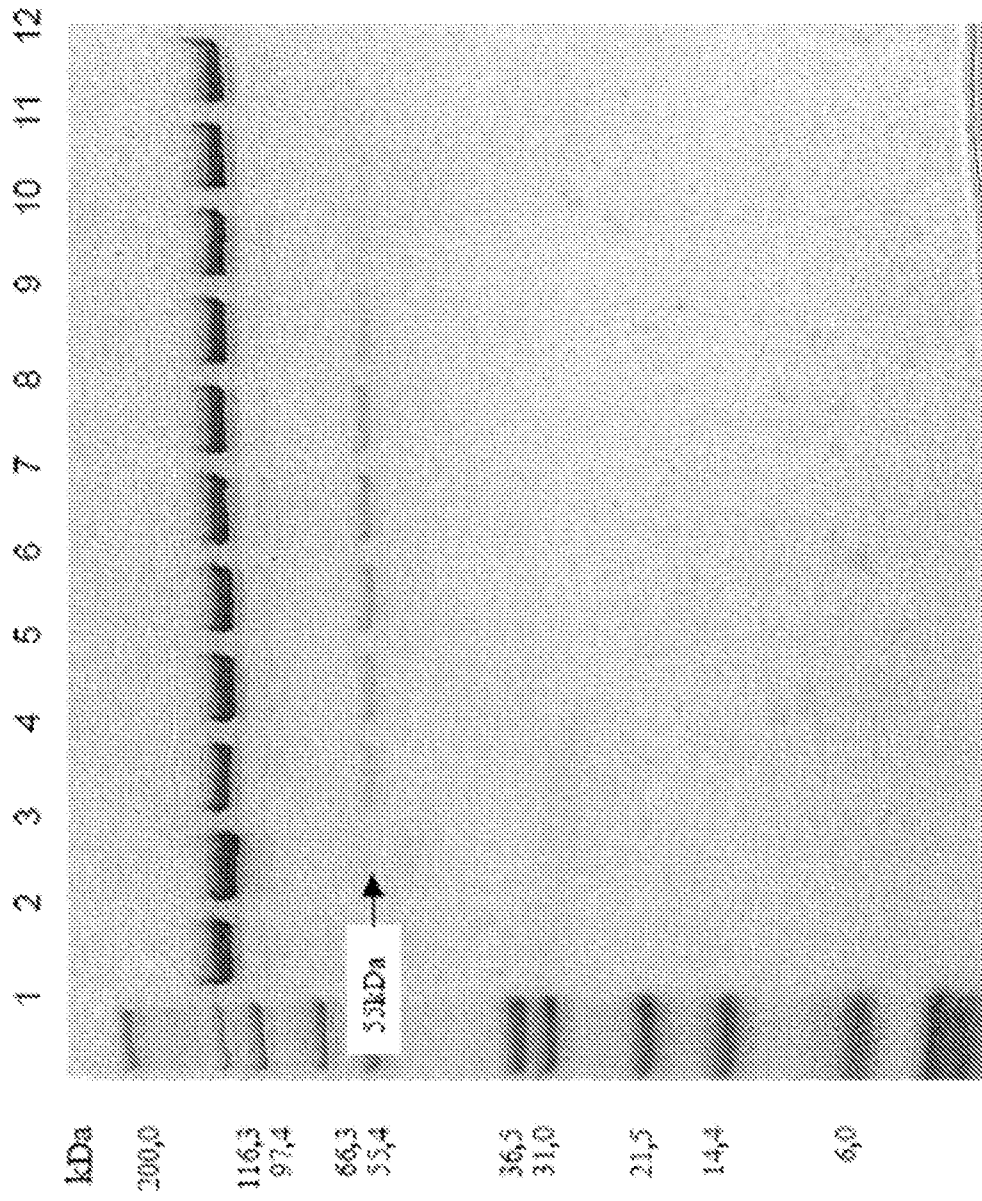


FIG. 75

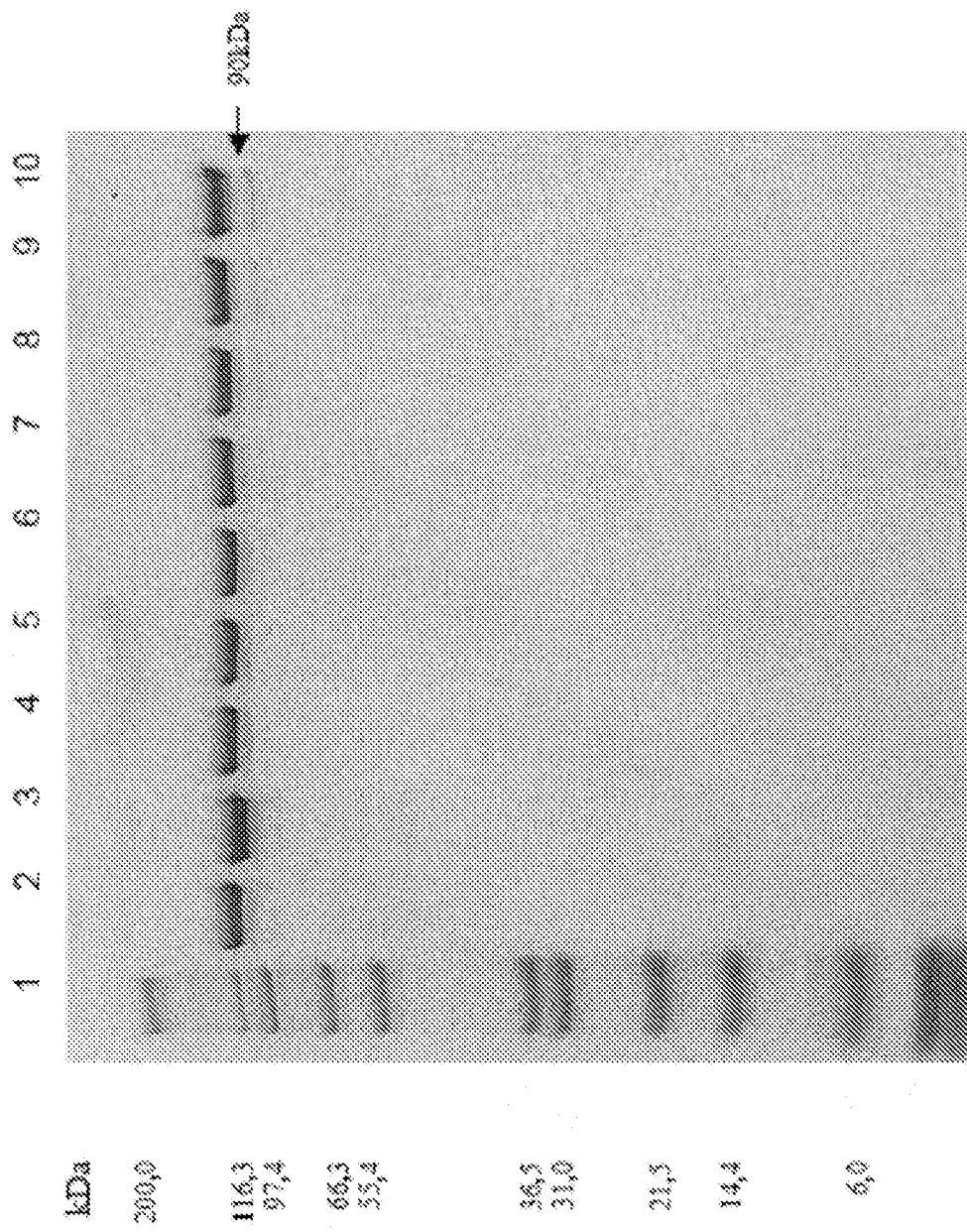


FIG. 76

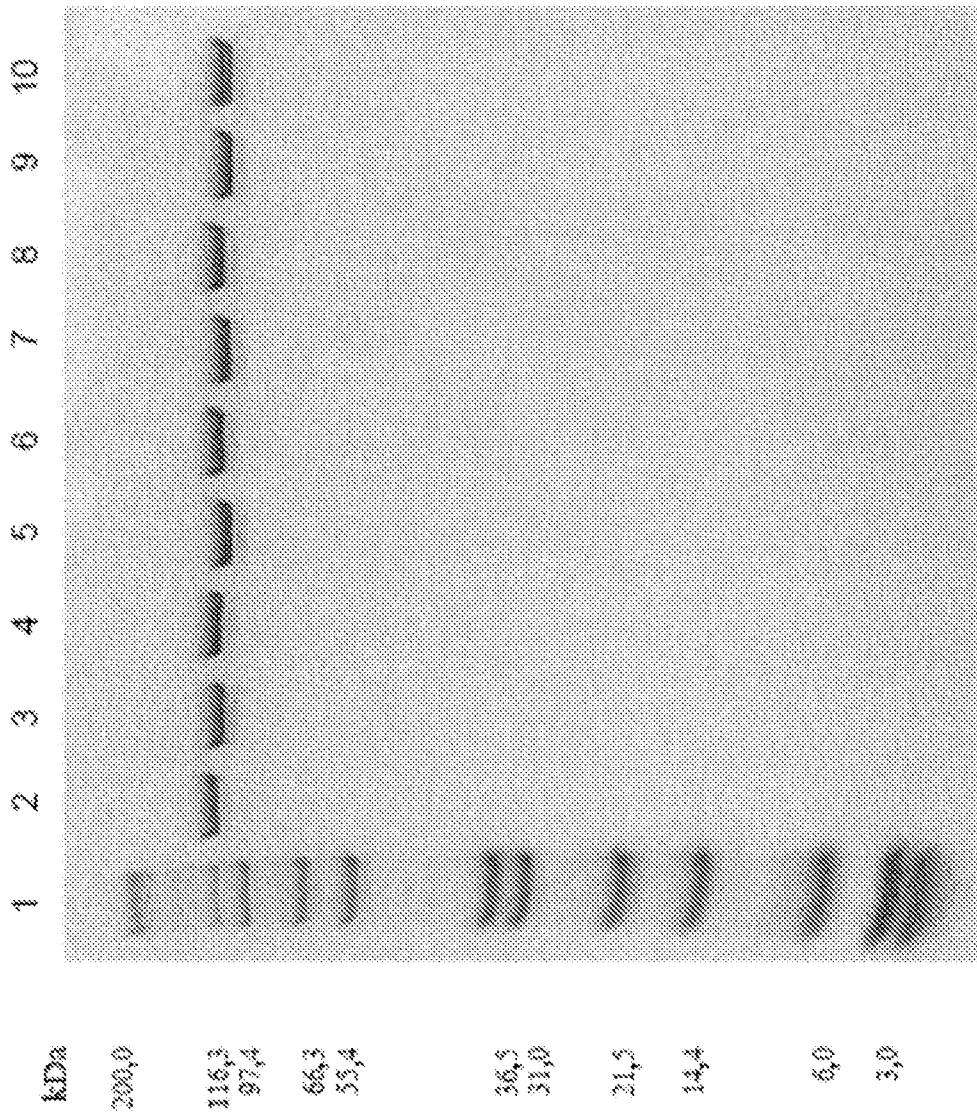


FIG. 77

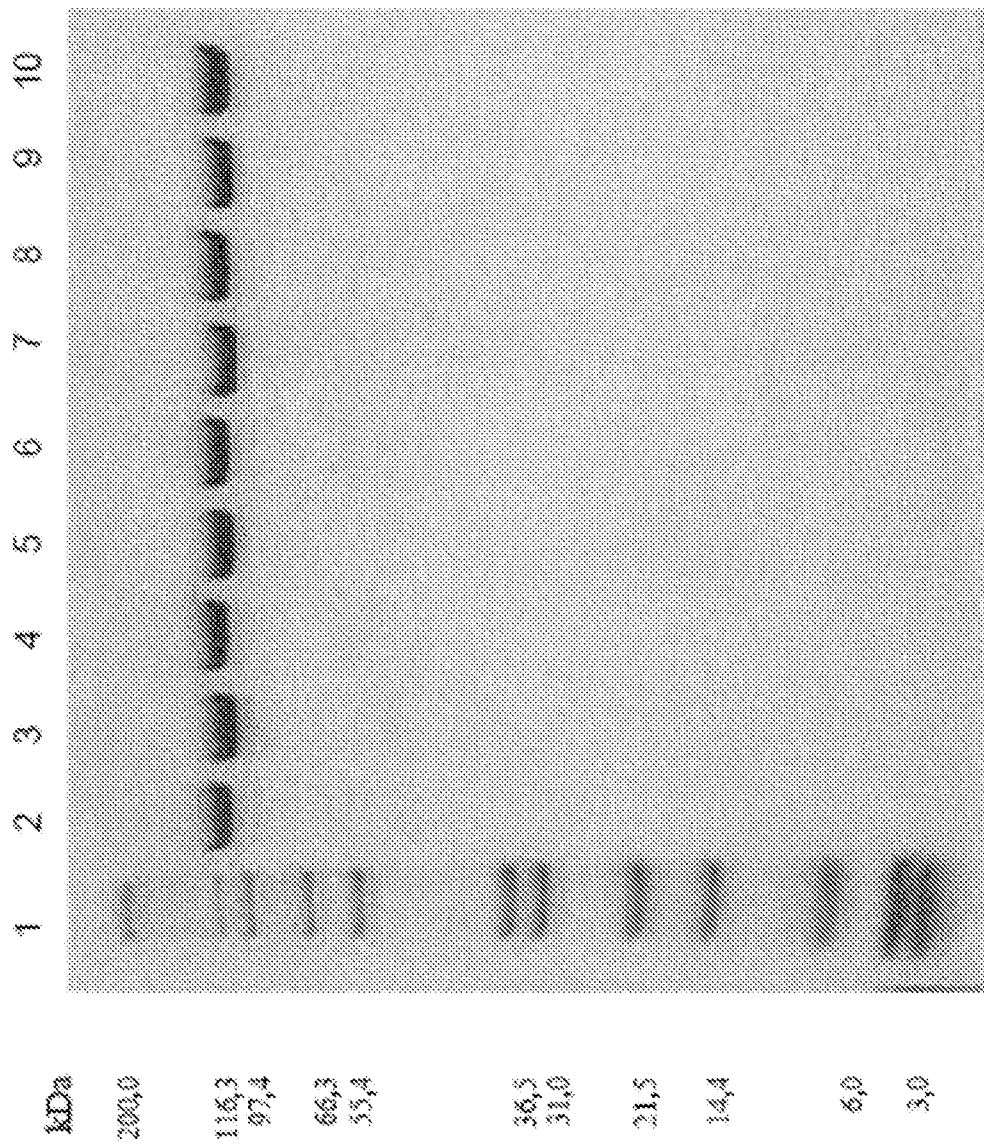


FIG. 78

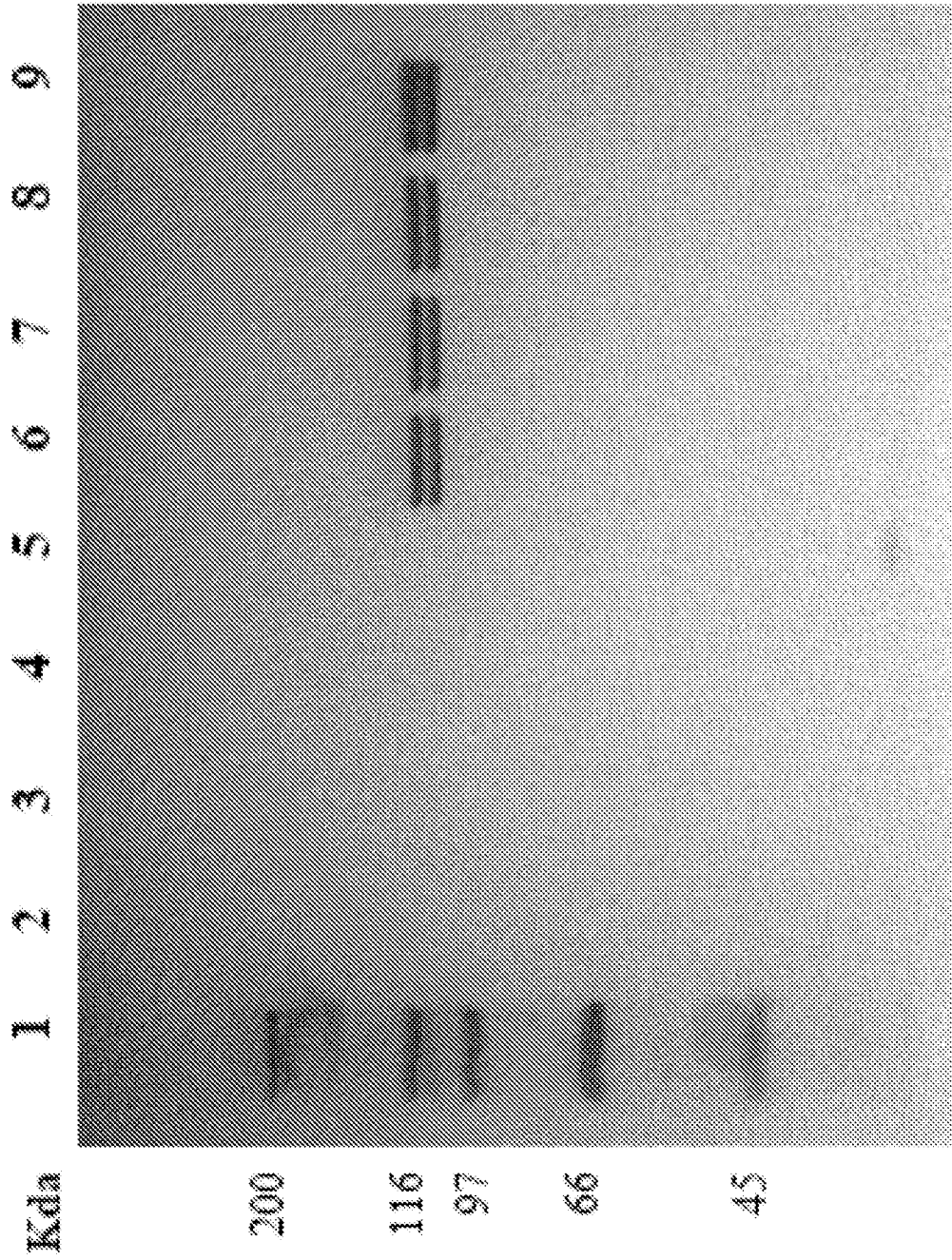


FIG. 79

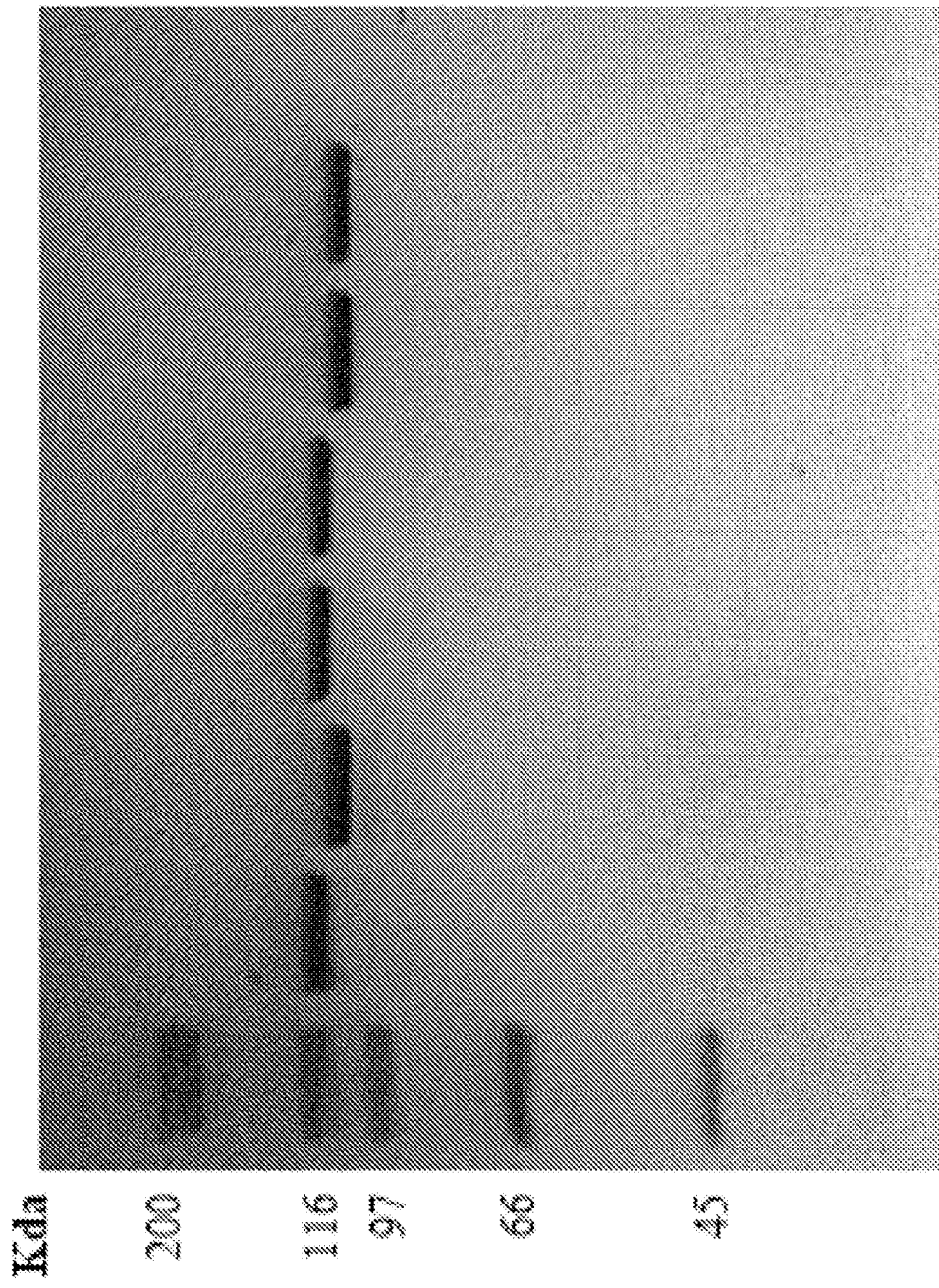


FIG. 80

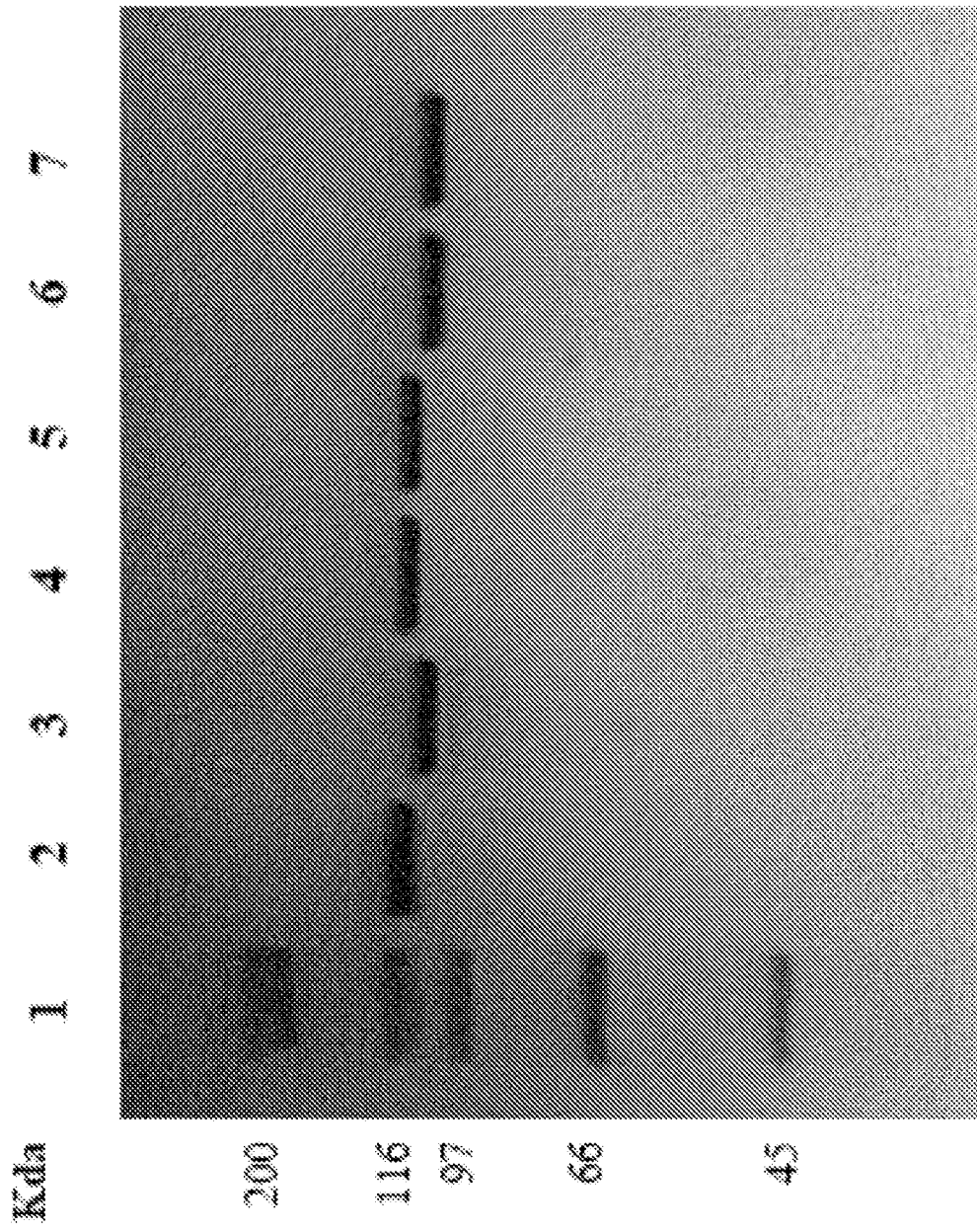


FIG. 81

Cromatografía analítica

Muestra	RP-HPLC				SEC-HPLC (% DE AREA)			
	AUX-I	AUX-II	Clostripaina	Otros	AUX-I	AUX-II	Agregados	Otros
Filtrado de fermentación Día 4	57,52	42,48	0,00	0,00	0,47	0,65	0,70	98,17
Filtrado de fermentación Día 6	52,97	47,03	0,00	0,00	0,48	0,64	0,73	98,14
Post Mustang Q Día 4	41,23	52,16	0,00	6,61	0,56	0,75	0,78	97,91
Post HIC Día 3	44,00	55,00	0,00	1,00	49,46	48,72	0,00	1,83
Post HIC Día 6	44,42	54,52	0,00	1,05	49,29	48,92	0,00	1,79
Post TFF Día 2	49,69	48,09	0,14	2,07	50,77	47,37	0,00	1,86
Post TFF Día 4	49,60	47,88	0,21	2,31	50,29	47,73	0,00	1,98
Post IEX AUX-I Día 5	99,17	0,65	0,00	0,18	100,00	0,00	0,00	0,00
Post IEX AUX-I Día 12	96,42	1,56	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00
Post IEX AUX-II Día 5	0,56	98,72	0,17	0,55	0,00	100,00	0,00	0,00
Post IEX AUX-II Día 12	0,32	99,04	0,17	0,48	0,00	99,38	0,62	0,00
AUX-I intermedio Día 6	96,60	1,10	0,05	0,25	100,00	0,00	0,00	0,00
AUX-I intermedio Día 12	99,01	0,66	0,04	0,27	100,00	0,00	0,00	0,00
AUX-II intermedio Día 6	0,47	98,95	0,11	0,47	0,00	100,00	0,00	0,00
AUX-II intermedio Día 12	0,28	99,12	0,13	0,47	0,00	100,00	0,00	0,00

FIG. 82

Determinación de la concentración de proteínas por UV

Descripción de la muestra	Conc. por UV (mg/ml)
Filtrado de fermentación día 4	22,1
Filtrado de fermentación día 5	22,0
Post Mustang Q día 4	47,2
Post HIC Día 3	0,54
Post HIC Día 6	0,55
Post TFF Día 2	2,18
Post TFF Día 4	2,13
Post IEX AUX-I Día 5	1,09
Post IEX AUX-I Día 12	1,09
Post IEX AUX-II Día 5	1,16
Post IEX AUX-II Día 12	1,18
AUX-I intermedio Día 6	1,09
AUX-I intermedio Día 12	1,13
AUX-II intermedio Día 6	0,94
AUX-II intermedio Día 12	0,97

FIG. 83

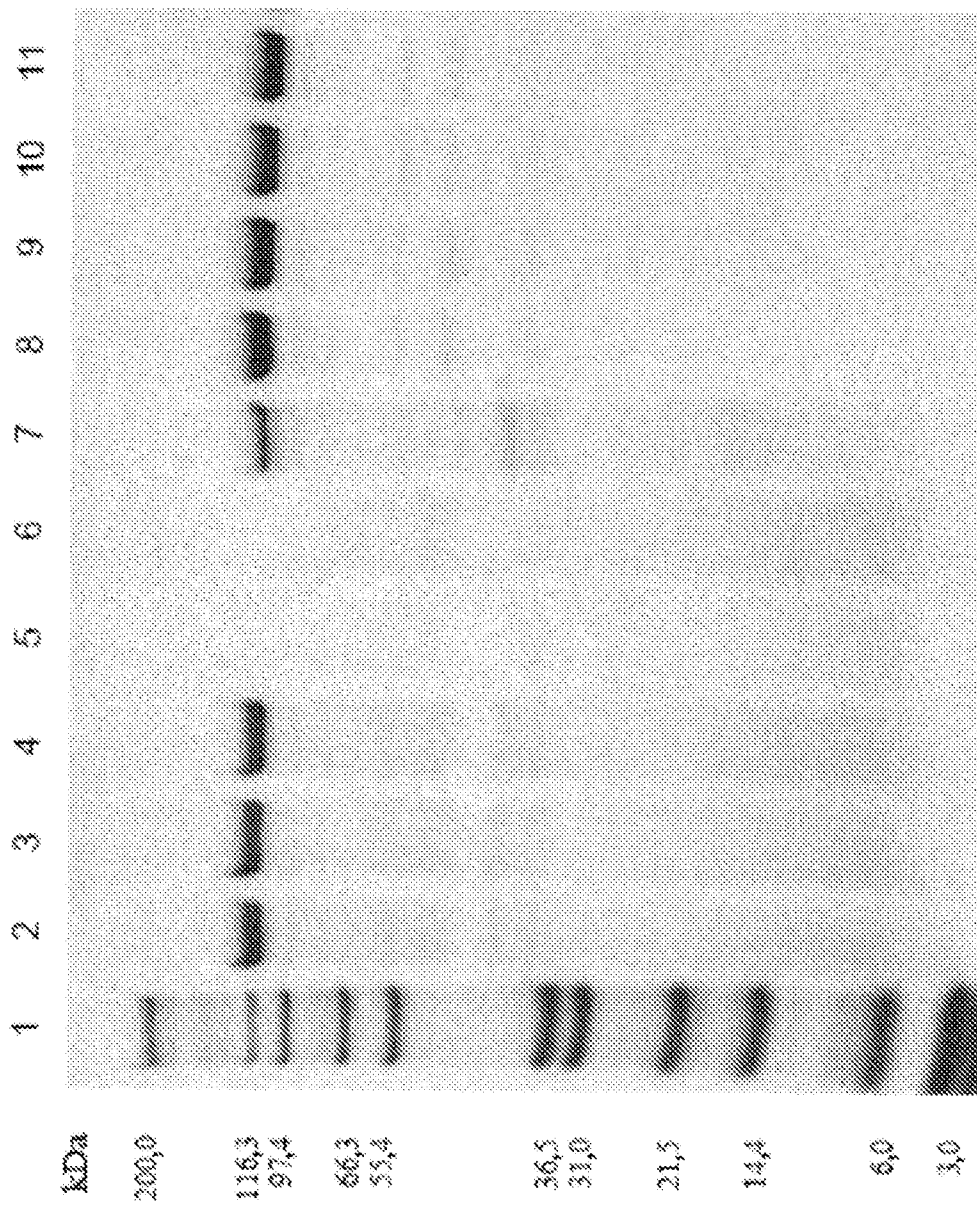


FIG. 84

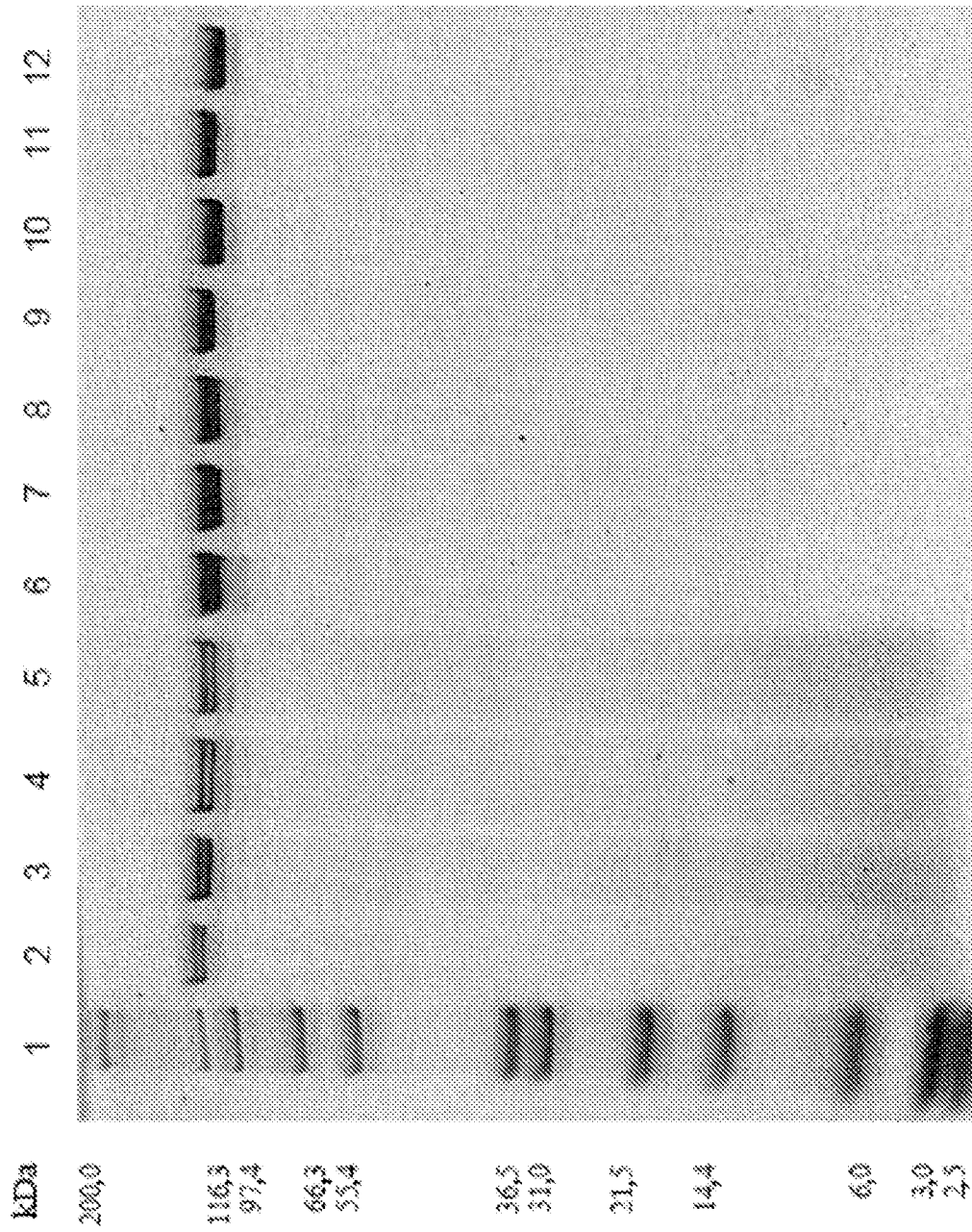


FIG. 85

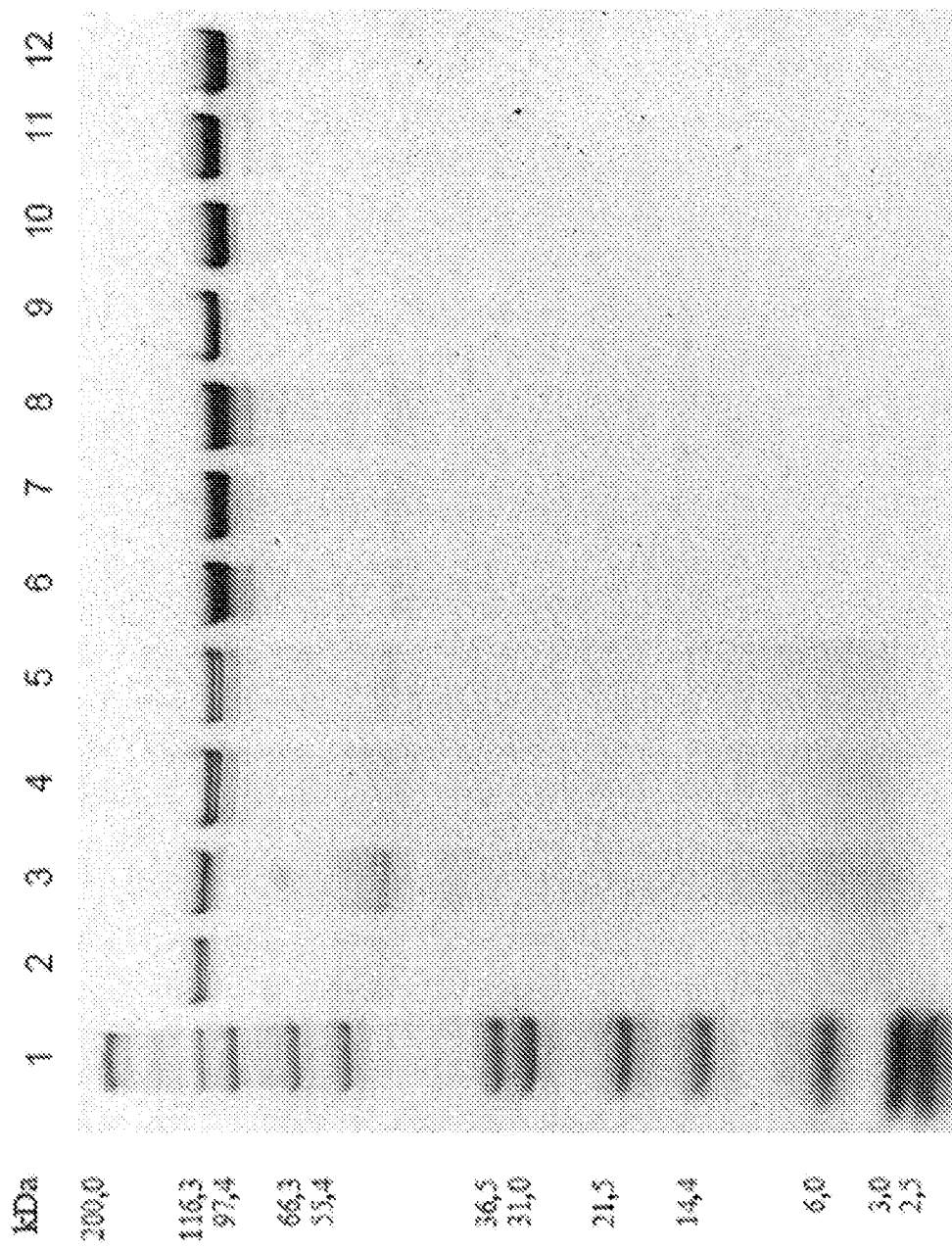


FIG. 86

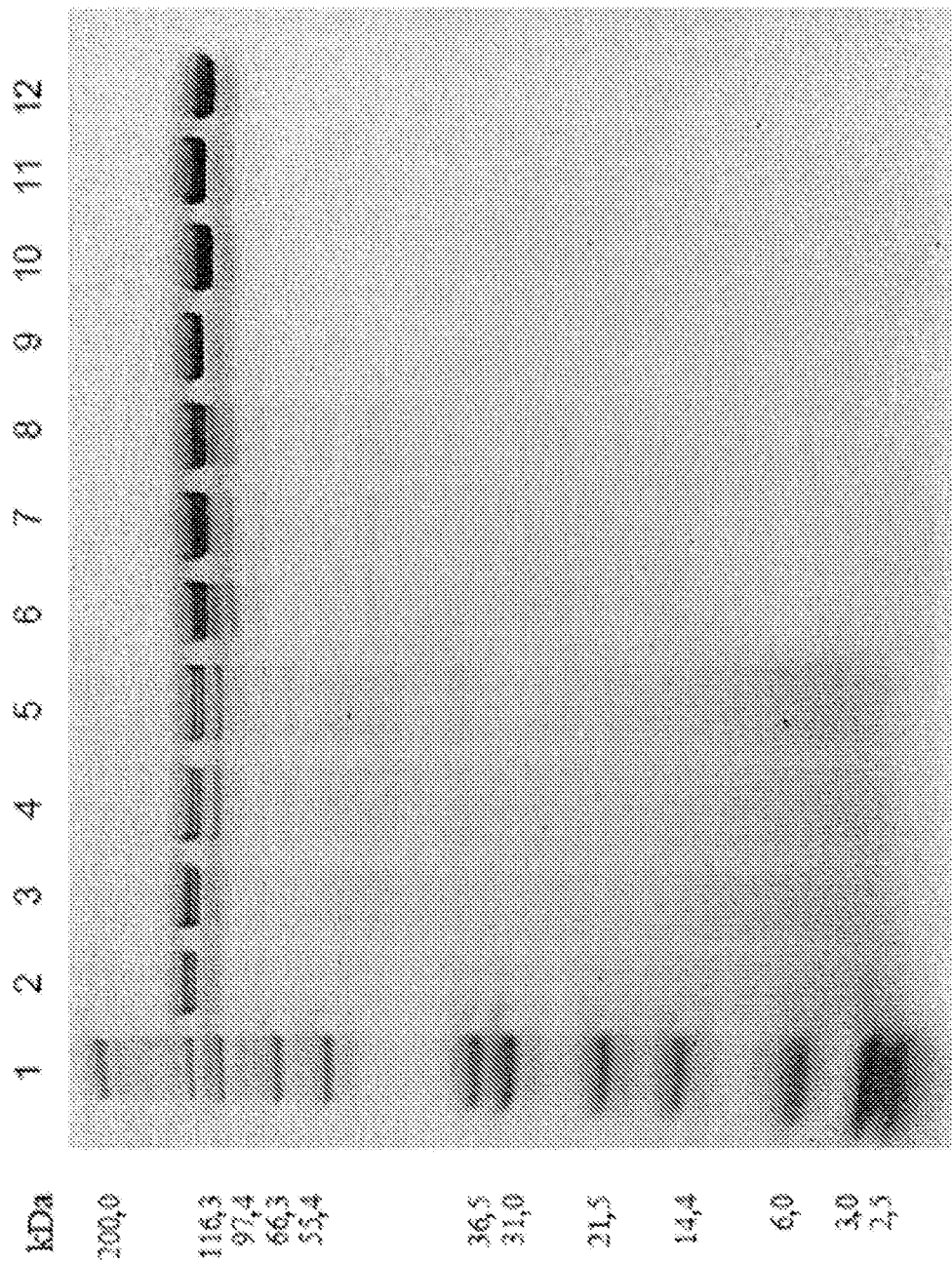


FIG. 87

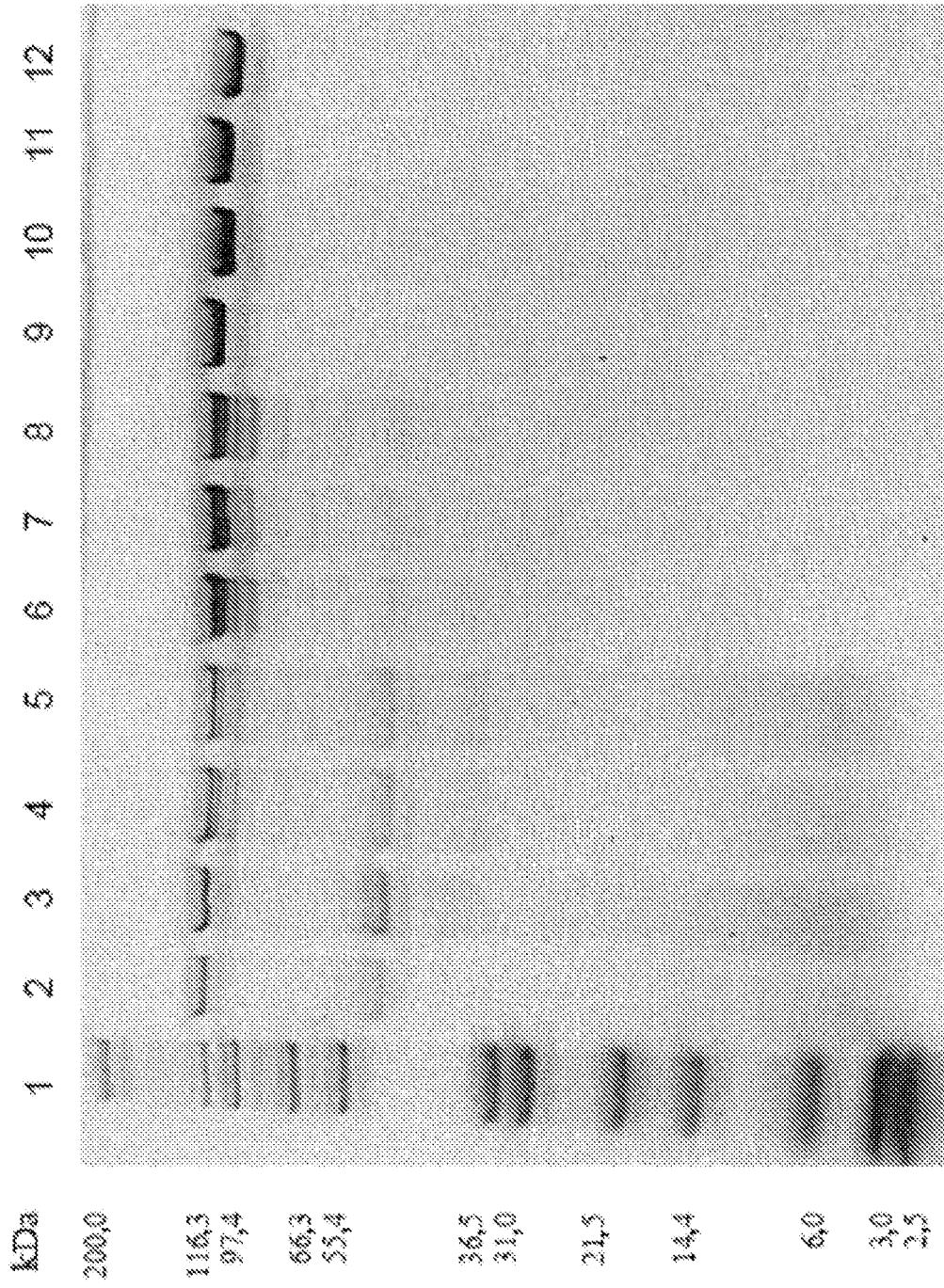


FIG. 88

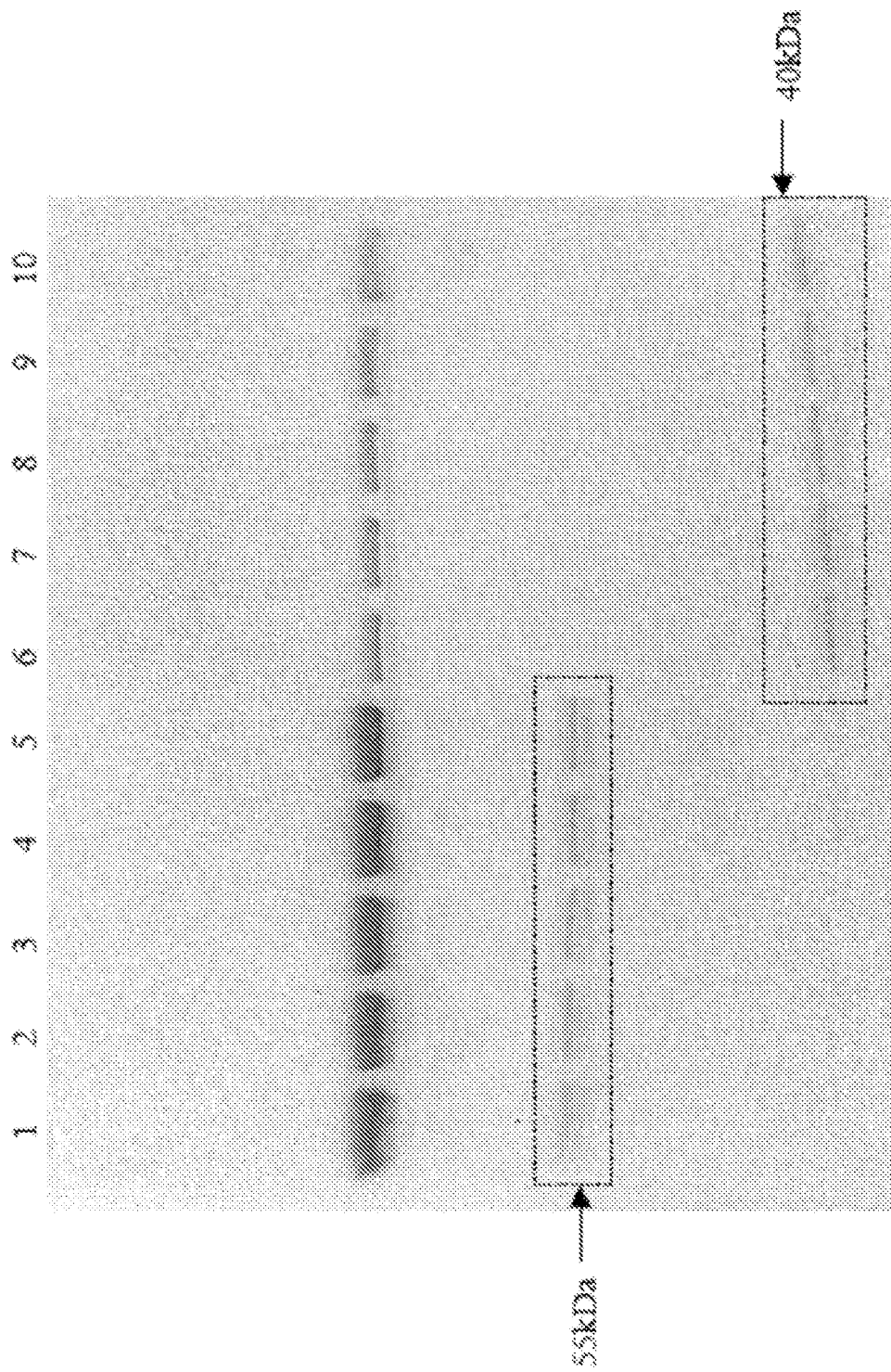


FIG. 89

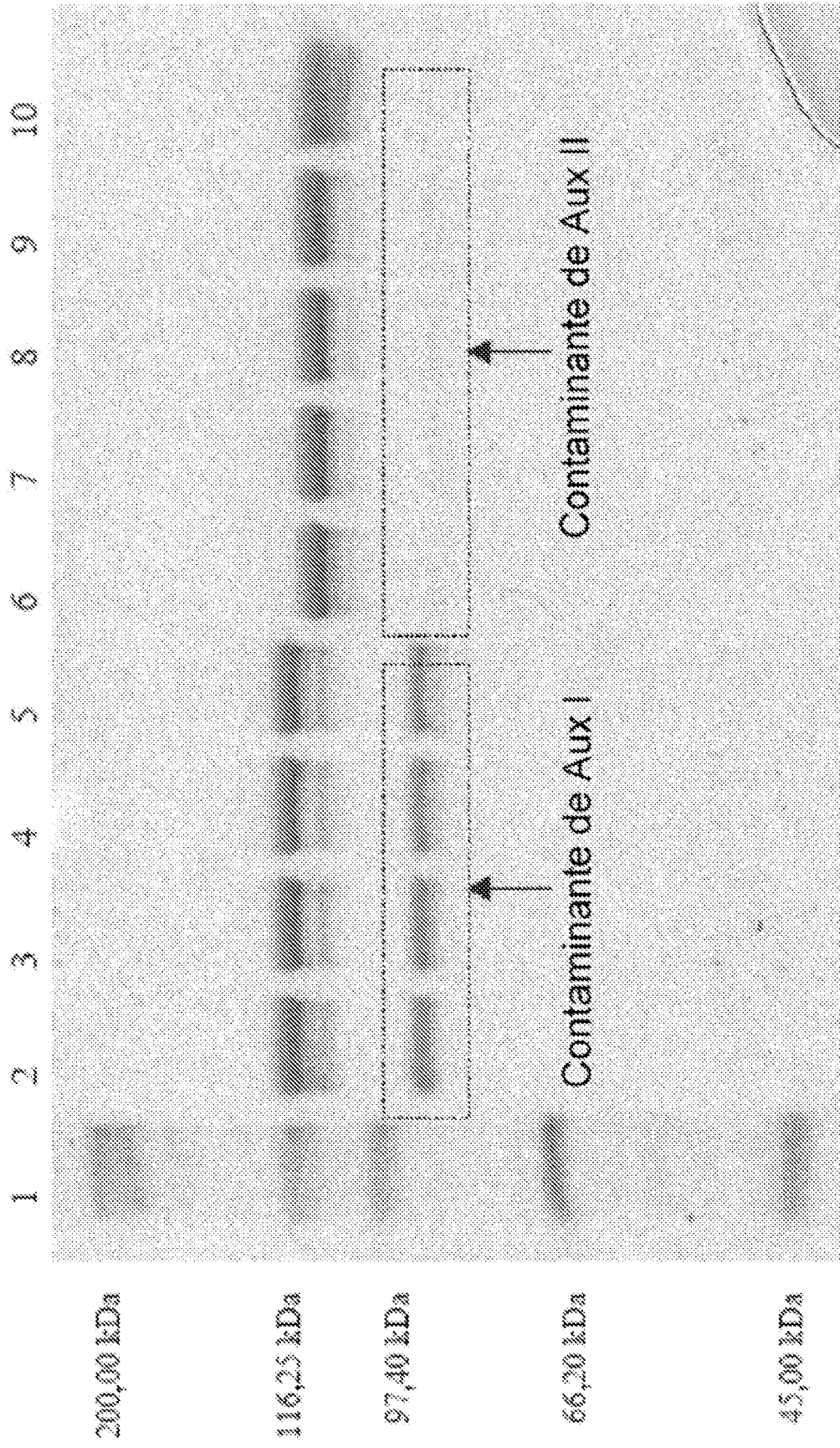


FIG. 90