

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.07.05	(73) Titular(es): FIDIA FARMACEUTICI S.P.A.	
(30) Prioridade(s): 2005.07.07 IT PD20050207	VIA PONTE DELLA FABBRICA, 3/A I-35031	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.03.26	ABANO TERME	IT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.09.08 241/2010	(72) Inventor(es): SUSANNA VACCARO, GIOVANNI GENNARI LANFRANCO CALLEGARO ANTONIO GIANNELLI SALVATORE CARUSO	IT IT IT IT IT
	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **NOVAS COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ÁCIDO HIALURÓNICO E COLAGENASE PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE FERIDAS, QUEIMADURAS E ÚLCERAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DIZ RESPEITO A NOVAS COMPOSIÇÕES CONTENDO ÁCIDO HIALURÓNICO, OU SEUS DERIVADOS EM ASSOCIAÇÃO COM A ENZIMA PROTEOLÍTICA COLAGENASE (E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS RELACIONADAS) PARA A PREPARAÇÃO DE UM PENSO PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VÁRIOS TIPOS DE FERIDAS, QUEIMADURAS DE VÁRIOS GRAUS, ESCARAS DE PRESSÃO, ÚLCERAS VASCULARES E ÚLCERAS DOS PÉS DIABÉTICOS, ASSIM COMO PARA O TRATAMENTO DE CICATRIZES HIPERTRÓFICAS E QUELOIDES.

Resumo

"Novas composições farmacêuticas contendo ácido hialurónico e collagenase para o tratamento tópico de feridas, queimaduras e úlceras"

A presente invenção diz respeito a novas composições contendo ácido hialurónico, ou seus derivados em associação com a enzima proteolítica collagenase (e composições farmacêuticas relacionadas) para a preparação de um penso para o tratamento tópico de vários tipos de feridas, queimaduras de vários graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras dos pés diabéticos, assim como para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

Descrição

"Novas composições farmacêuticas contendo ácido hialurónico e collagenase para o tratamento tópico de feridas, queimaduras e úlceras"

Campo da Invenção

A presente invenção diz respeito a novas composições contendo derivados de ácido hialurónico em associação com a enzima proteolítica collagenase (e composições farmacêuticas relacionadas) para a preparação de um penso para o tratamento tópico de vários tipos de feridas, queimaduras de vários graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras dos pés diabéticos, assim como para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

Antecedentes da Invenção

A remoção enzimática de detritos de tecido necrótico envolve a remoção de tal tecido, através da acção de enzimas não tóxicas que são capazes de degradar colagénio desnaturado, fibrina e elastina presentes no tecido desvitalizado, preservando o tecido viável.

Esta técnica é preferida em relação a uma remoção de detritos mecânica/cirúrgica, porque é mais selectiva em relação ao tecido de granulação e é especialmente adequada a lesões não infectadas, tais como úlceras da pele de diversas etiologias e de profundidade variada.

As formulações enzimáticas disponíveis actualmente no mercado contêm a enzima proteolítica collagenase (Noruxol® e Iruxol®), ou são constituídas por uma associação de fibrinolisisina e desoxiribonuclease (Elase®), sendo todas eficazes (embora com diferentes resultados) na remoção de tecido necrótico, exsudado purulento e fibrina (Mekkes J. R., Arch Dermatol Rese, 1998, 290:152-157).

De grande interesse do ponto de vista de aplicação é a colagenase produzida a partir de bactérias da espécie *Clostridium*, apesar da colagenase produzida a partir *Vibrio Alginolyticus* (Achromobacter colagenase EC 3.4.24.08); Borivoj K., Matrix Supplement, 1992, 1 127-133; EP0115974B1) produzida a partir de uma estirpe não patogénica com uma actividade específica que é marcadamente superior à da enzima produzida a partir de *Clostridium* tem sido largamente descrita e caracterizada (embora não tendo sido ainda comercializada).

A colagenase é uma proteína que é muito instável em soluções aquosas, mesmo a baixas temperaturas. Além disso pode ser facilmente desnaturada por agentes quelantes e vários iões metálicos que podem interactivar com o ião cálcio que é essencial para a actividade enzimática da molécula.

É uma enzima que é extremamente sensível a processos químico-físicos tais como de congelação, descongelação, liofilização e secagem, processos que são muitas vezes necessários no decurso da preparação das formulações farmacêuticas finais. Foram testadas por isso várias formulações diferentes para encontrar uma composição final que contém uma colagenase estável, e por isso activa (EP0543521B1, pedido de patente de invenção WO 96/41870, WO93/00807, WO94/24273).

Se bem que numa fase experimental, a enzima é utilizada na forma injectável para tratar a contractura de Dupuytren, um estado de deformação dos dedos, enquanto que a utilização da colagenase é particularmente importante para reduzir o glaucoma, uma desordem que provoca uma pressão excessiva no olho que pode danificar o nervo óptico, associada a um depósito anormal do colagénio no ducto que drena fluidos biológicos da câmara anterior do olho.

A enzima collagenase é indicada principalmente para a remoção de detritos de queimaduras de vários graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras de pés diabéticos. Além disso é utilizado para tratar cicatrizes hipertróficas e queloides.

Uma cura adequada de feridas necessita de uma nova fase de epitelização adequada que se segue à fase da remoção da escara, possivelmente por remoção de detritos por via cirúrgica e/ou enzimática. O colagénio é o componente principal do tecido necrótico e, conseqüentemente é fundamentalmente importante removê-lo para favorecer a nova epitelização da ferida. Contudo, no decurso desta operação é necessário proteger a pele circundante para evitar fenómenos de irritação dolorosos resultantes da utilização da collagenase como a enzima capaz de degradar o colagénio desnaturado e natural, de hidrolisar as ligações peptídicas da cadeia de aminoácidos. Durante a remoção enzimática de detritos a área da ferida a ser tratada não diminui de tamanho e pode mesmo aumentar. Por isso, quando a escara foi removida, o tecido de granulação recentemente formado é exposto e conseqüentemente exposto a infecções bacterianas perigosas que podem pôr em risco a cura completa da lesão.

O processo de cura da ferida é um fenómeno complexo que envolve muitos tipos de factores celulares e humorais, e muitas fases que poderiam favorecer a formação de cicatrizes patológicas, tais como cicatrizes hipertróficas e queloides.

Uma cura adequada necessita da aplicação de fármacos para guiar (e acelerar) o processo de cura das feridas. A literatura científica e de patentes contém amplas descrições reivindicando designado o ácido hialurónico (HA) como o factor principal nos processos de regeneração de tecido (pedido de patente de invenção europeia EP1196179).

De facto, graças às suas características químicas-físicas e biológicas, o ácido hialurónico participa e modula todas as fases sequenciais principais da cura de feridas:

- Inflamação
- Formação de tecido de granulação
- Nova epitelização
- Remodelação da cicatriz.

Devido às suas propriedades químico-físicas o dito polissacárido controla a hidratação do tecido, criando o microclima correcto necessário a uma cura rápida; além disso a sua elevada viscosidade protege a ferida de possíveis infecções bacterianas e/ou virais.

Graças às suas propriedades biológicas o ácido hialurónico demonstrou ser eficaz na protecção contra radicais livres ao controlar processos inflamatórios e estimular a angiogénese. O seu papel no controlo da expressão de citocinas e factores tróficos foi demonstrado e na estabilização do tecido de granulação favorecendo e regulando o fluxo de fibroblastos e células endoteliais para a ferida durante a nova epitelização.

Por último, os dados experimentais demonstraram um envolvimento do ácido hialurónico no controlo da proliferação de queratinócitos e no depósito do colagénio nas feridas, reduzindo desta forma o tecido fibrótico e, por isso, a cicatrização patológica (John Chen W. Y. et al., Wound Repair and Regeneration, 1999, 7:79-89).

O HA é um heteropolissacárido composto por resíduos alternados de ácido-D-glucurónico e N-acetil-D-glucosamida. É um polímero de cadeia linear com um peso molecular na gama de 50000 a 13×10^6 Da, dependendo da fonte a partir da qual é obtida e os processos utilizados para o preparar.

Encontra-se presente na natureza nos geles pericelulares, a substância fundamental do tecido

conjuntivo em organismos vertebrados (da qual representa um dos componentes principais), no fluido sinovial das articulações, no humor vítreo e no cordão umbilical.

O HA desempenha por isso um papel importante no organismo biológico (para além dos descritos acima), como um suporte mecânico das células de muitos tecidos, tal como a pele, tendões, músculos e cartilagem.

O dito polissacárido é conhecido por ser utilizado como um veículo de fármacos de vários tipos, em associações simples ou salificadas com ácido hialurónico, uma vez que as suas propriedades especiais de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-imunogenicidade, viscosidade e capacidade de hidratação tornam-no especialmente adequado como um sistema de libertação de fármacos e moléculas, tanto a nível tópico como a nível sistémico (EP0197718B1 EP0445255B1). De facto, experiências pré-clínicas com o HA associado com anti-inflamatórios (tal como Diclofenac) para utilização tópica demonstraram que o HA aumenta significativamente a absorção do fármaco na pele (quando comparado com controlos), onde graças à acção específica do ácido hialurónico é compartimentado para formar “um reservatório”, que minimiza a absorção adicional através da pele. A acção do fármaco (e eficácia) é assim significativamente aumentada (Brown M. B. et al., JEADV 2005, 19:309-318).

A EP0637450 diz respeito a uma composição farmacêutica injectável para o tratamento de cicatrizes compreendendo ácido hialurónico e collagenase, enquanto que Rafanelli et al. no artigo “Clinical Study of hyaluronic acid activity in ulcerations of the lower extremities” *Chronica dermatologica*, 1986, vol.17, N° 2, páginas 251-258 avaliam o papel do ácido hialurónico *per se* ou em relação com a CAF-collagenase na sua actividade de reparação dos membros inferiores ulcerados.

A requerente, ao contrário da descrição acima de HA como um sistema de administração constatou surpreendentemente uma associação entre o HA e/ou os seus derivados com a enzima collagenase determina uma redução clara na actividade do enzima possibilitando deste modo a degradação/remoção da escara com formação simultânea de tecido de granulação, graças à acção específica do HA.

Além disso, o dito polissacárido protege o tecido saudável que circunda a lesão da acção digestiva da collagenase aumentando deste modo o grau de cumprimento do modo de utilização do produto pelo doente.

Diminuindo a actividade proteolítica da collagenase, o ácido hialurónico manifesta propriedades que demonstram ser absolutamente opostas às do sistema de administração descrito acima como é conhecido do perito no estado da técnica.

Um outro objecto da presente invenção é representado pelas formulações farmacêuticas de natureza lipofílica, contendo collagenase numa associação com HA que possibilita a estabilização completa da enzima e, por isso, a sua manutenção numa forma activa à temperatura ambiente durante períodos prolongados de tempo.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção descreve e reivindica a associação de HA e/ou dos seus derivados com a enzima collagenase em formulações farmacêuticas de natureza lipofílica que graças à presença de excipientes/estabilizadores especiais permitem que a enzima proteolítica permaneça estável à temperatura ambiente durante prolongados períodos de tempo.

Graças às propriedades especiais do HA na regeneração do tecido, a remoção enzimática, com a nova composição enzima/HA que modifica substancialmente as fases de remoção

de escaras e regeneração do novo tecido que se segue normalmente ao tratamento apenas com collagenase permitindo o estabelecimento de novas fases que determinam uma cura adequada das feridas sem a formação de cicatrizes patológicas:

- A degradação/remoção de escaras ocorre ao mesmo tempo que a formação de tecido de granulação;
- Formação de novo tecido conjuntivo determina a redução do tamanho da ferida após a remoção de cicatrizes (pelas razões fornecidas acima) e, assim, uma diminuição significativa no risco de infecções bacterianas e/ou virais;
- O tecido circundante saudável é protegido da acção digestiva da collagenase devido a HA;
- A remoção de escaras pode ser efectuada sem dor

As reivindicações das novas formulações collagenase/HA descritas acima são possíveis porque HA demonstrou ser capaz de modular a actividade proteolítica da collagenase diminuindo significativamente a sua acção durante a remoção enzimática do tecido necrótico como demonstrado a seguir.

A formulação de enzima/HA é particularmente indicada na remoção de detritos de queimaduras de vários graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras de pés diabéticos, feridas de várias naturezas e de diferentes dimensões e profundidade, além disso, no tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides com um cumprimento final do modo de utilização do produto pelo doente que é decididamente muito maior do que com a enzima isolada.

Além disso, a dita composição é também reivindicada no tratamento da contractura de Dupuytren e do glaucoma.

Os derivados de HA que podem ser utilizados nas novas formulações que são objectivo da presente invenção são listados abaixo:

1. HA salificado com bases orgânicas e/ou inorgânicas com um peso molecular de 50-730kDa (EP0138572B1) ou com um peso molecular elevado de 750-1230 kDa, (EP535200B1);
2. Hyaff®: ésteres de HA com álcoois das séries alifáticas, aralifáticas, cicloalifáticas, aromáticas, cíclicas ou heterocíclicas, com uma percentagem de esterificação que pode variar de acordo com o tipo e comprimento do álcool utilizado, entre 1 a 100%, preferencialmente entre 50 e 75% (EP216453B1);
3. Hyadd™: amidas de HA com aminas da série alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica e heterocíclica com uma percentagem de amidação entre 1 e 10%, preferencialmente 4% (EP1095064B1);
4. Derivados O-sulfatados de HA até ao 4º grau de sulfatação (EP 0702699B1);
5. Ésteres internos ACP® de HA com uma percentagem de esterificação interna entre 0,5 e 10% e preferencialmente 5% (EP0341745B1);
6. Derivados de HA desacetilados derivados da desacetilação da fracção de N-acetil-glucosamina com uma percentagem de desacetilação preferencialmente entre 0,1 e 30%, enquanto que todos os grupos carboxilo de HA podem ser salificados com bases orgânicas e/ou inorgânicas (EP1313772B1);
7. Hyoxx™: derivados percarboxilados de HA obtidos a partir da oxidação do hidróxilo primário da fracção de N-acetilglucosamina com um grau de percarboxilação entre 0,1 e 100% e preferencialmente entre 25 e 75%. Todos os grupos carboxilo da HA podem ser salificados com bases

orgânicas e/ou inorgânicas (pedido de patente de invenção N° EP1339753).

O HA utilizado na presente invenção como tal, ou na preparação dos seus derivados poder ser originário de qualquer fonte, por exemplo pode ser obtido por extracção de cristas de galo (EP0138572B1), por fermentação, ou através de meios tecnológicos e o seu peso molecular pode variar entre 400 e 3×10^6 Da, em particular entre 1×10^5 Da e 1×10^6 Da, e mais particularmente entre 50000 e 200000 Da.

A concentração da enzima collagenase para ser utilizada em associação com HA ou com os seus derivados pode variar entre 0,01 U e 100 U/miligramma de HA, preferencialmente entre 0,1 e 20U e mais preferencialmente entre 0,2 e 10U/mg de HA.

A concentração final de HA ou dos seus derivados na composição farmacêutica final pode variar entre 0,01 e 5% em peso/peso do produto final que varia preferencialmente entre 0,1 e 2% p/p, e mais preferencialmente ainda entre 0,2 e 0,4% p/p.

Uma unidade de collagenase é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmole de PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg num segundo a um pH igual a 7,1 e 37°C (PZ=4-fenilazobenzoyloxycarbonil) (Wunsch E. et al. *Physiol Chem.* 1963, 333:149-151).

A collagenase preferencialmente utilizada ou para ser utilizada nas composições que são o objecto da presente invenção é a produzida a partir do microrganismo não patogénico que pertence à estirpe *Vibrio Alginolyticus* sub. Lophagus, NCIMB (Collection of Industrial and Marine Bacteria), número da estirpe 11038, estirpe equivalente: LMG 3418.

É um microrganismo gram negativo que produz uma collagenase com um peso molecular de 90000 a 110000 Daltons

(IUBMB nomenclatura: EC 3.4.24.3), um pH estável na gama de 4,0 e 11,0, mas com um pH óptimo entre 6,0 e 8,0, estável a temperaturas que variam entre 4 e 40°C com uma temperatura óptima de 37°C.

A enzima é definida como uma metalopeptidase, porque quebra o colagénio em fragmentos peptídicos, actuando directamente na sua estrutura proteica de cadeia tripla. A actividade específica da enzima é inibida pelos sais de prata e de cobre e também pelos agentes quelantes, tais como EDTA, que se ligam ao ião cálcio necessário à actividade da collagenase.

Actividade collagenolítica da collagenase de *Vibrio Alginolyticus* em relação à actividade da mesma enzima associada com o ácido hialurónico

O objectivo do estudo foi comparar a actividade da enzima como tal com a da nova composição da collagenase/HA para observar a influência do ácido hialurónico na actividade proteolítica da mesma enzima.

Material:

- colagénio extraído da pele de bovino a uma concentração de 1 mg/ml (de tampão preparado como descrito a seguir) como um substracto para a actividade enzimática.
- collagenase extraída de *Vibrio Alginolyticus* testado a três concentrações diferentes de 0,33, 0,66 e 1,32 unidades enzimáticas;
- collagenase extraída de *Vibrio Alginolyticus* testado para as mesmas três concentrações de 0,33, 0,66 e 1,32 U, mas associada com o ácido hialurónico nas proporções seguintes: 0,16U/mg de HA, 0,33U ou 0,66 U/mg de HA (e assim, 0,33, 0,66 e 1,32 U estão associadas com 2 mg de

HA). Em todos os três casos, a concentração do polissacárido foi mantida constante.

Processo de digestão enzimática

O processo de degradação do colagénio foi efectuado a 37°C durante um tempo fixado inicialmente em 90 minutos. Subsequentemente o processo foi repetido nas mesmas concentrações e à mesma temperatura, mas a reacção foi mantida durante 4 e 12 horas após ter sido iniciada.

A reacção de digestão foi iniciada em tampão tris-HCl, 0,05 M contendo CaCl_2 0,01 M a pH=7,4 ao qual o substrato da reacção tinha sido adicionado ou a própria collagenase ou a enzima associada com concentrações fixas de HA como descritas acima.

Resultados:

A mistura de digestão enzimática obtida (enzima e produtos de degradação relativos ao colagénio) foi analisada num gel de 7% de poliacrilamida (Electroforese: SDS-PAGE; Laemmli U. K., Nature, 1970, 680-685) para mapear os vários fragmentos de proteínas separados de acordo com o seu peso molecular (MW) e corados com azul de Comassie.

Após a corrida de electroforese o colagénio separa-se em subunidades com um MW de cerca de 100000 Daltons com outros fragmentos de péptidos com um MW de cerca de 33000 Daltons.

Todos os geles foram carregados com padrões de peso molecular com colagénio não digerido como controlo positivo com o colagénio degradado pela collagenase como tal e enzima relativa carregada separadamente e, por fim, com colagénio degradado por collagenase associada com HA e enzima isolada.

A Figura 1 mostra claramente que enzimas de 0,33U degradam apenas parcialmente o colagénio em 90 minutos mas; acima de tudo, que a presença de HA na composição collagenase/HA (na mesma concentração da enzima) modifica a acção collagenolítica da enzima reduzindo a sua actividade.

As figuras 2 e 3 mostram ainda a acção moduladora exercida pelo ácido hialurónico na enzima: após 90 minutos 0,66 e 1,32 U de collagenase degradam completamente o colagénio enquanto que especialmente a 0,66 U, o HA atrasa a acção collagenolítica da enzima. A influência do dito polissacárido na enzima é ainda mais evidente com 1,32 U de collagenase.

As figuras 4 e 5 mostram a situação após 4 e 12 horas: após 4 horas de incubação da enzima (0,66 U) com colagénio é ainda possível observar a acção do HA na collagenase porque as fracções de proteína não digerida de colagénio são visíveis, embora ligeiramente após 12 horas (novamente com 0,66 U de enzima) a acção moduladora do polissacárido deixa de ser evidente e o colagénio é completamente degradado.

Com objectivos puramente descritivos e sem estarem limitados pelos mesmos reportamos a seguir alguns exemplos de como novas formulações que são o objecto da presente invenção podem ser preparadas:

Processo para produzir o lipogel de collagenase/HA

Preparação dos componentes funcionais do lipogel:

Uma solução aquosa inicial, ou uma solução tampão a pH 7,1 (Tris HCl 25 mM, CaCl₂ 10 mM) é preparada com 82,7 U/ml de collagenase; 45 ml desta solução é liofilizada com os excipientes seguintes: maltose (18 g) como diluente/estabilizador, carragenina, possivelmente purificada (0,54 g) como estabilizador e água 45 g. 18,6 g

de produto liofilizado é obtido (produto seco) como se segue

- maltose 95% p/p
- carragenina 2,8% p/p
- colagenase 0,9% p/p

O produto liofilizado é então micronizado.

Ao mesmo tempo o HA obtido por fermentação e com um MW de 160 kDa é também micronizado.

Dispersão dos componentes funcionais na base lipofílica:

Exemplos 1 e 2

A enzima colagenase e HA preparada como descrita acima são dispersas homogeneamente numa base lipofílica constituída pelos excipientes seguintes:

- óleo de castor hidrogenado na forma de pó (com acção gelificante)
- álcool cetilestearílico (como agente de consistência)
- vaselina viscosa (como fase lipofílica)
- óleo de vaselina leve (como fase lipofílica)

Preparação da base lipofílica:

Dissolver e solubilizar a cerca de 88-90°C a vaselina viscosa e álcool cetilestearílico no óleo de vaselina. Quando se obtém uma massa fundida uniforme, dissolve-se e solubiliza-se o pó de óleo de castor hidrogenado na fase lipofílica recentemente formada.

Quando a massa está fundida de forma uniforme, arrefece-se a 25-30°C.

Lipogel: Exemplo 1A

Componentes principais	Função	% (p/p) (peso/peso)
HA micronizado		0,2
Colagenase liofilizada micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	5,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	36,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 1B

Componentes principais	Função	% (p/p) (peso/peso)
HA micronizado		0,2
Colagenase liofilizada micronizada		1,5 U/g
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	5,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	36,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 1C

Componentes principais	Função	% (p/p) (peso/peso)
HA micronizado		1
Colagenase liofilizada micronizada		
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	5,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	36,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 1D

Componentes principais	Função	% (p/p) (peso/peso)
HA micronizado (esterificado em 50% com álcool benzílico)		0,2
Colagenase liofilizada micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	5,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	36,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 2A

Componentes principais	Função	% (p/p)
HA micronizado		0,2
Colagenase liofilizada micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	10,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	34,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 2B

Componentes principais	Função	% (p/p)
HA micronizado		0,2
Seco por congelamento		2 U/g
Colagenase liofilizada micronizada		
Excipientes		
Óleo de castor hidrogenado	Agente de gelificação	1,0
Álcool cetilestearílico	Agente de consistência	10,0
Vaselina viscosa	Fase lipofílica	34,5
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Dispersão dos componentes funcionais na base lipofílica:

Exemplo 3

Incorporar e solubilizar o óleo de vaselina leve no vidrado de Jojoba agitar lentamente a 70-75°C (sistema de gelificação lipofílico baseado em copolímeros de estireno-

propileno-butileno em óleo de Jojoba) até ser obtida uma massa suave. Arrefecer à temperatura ambiente e depois adicionar com agitação, HA micronizado e collagenase lipofílica micronizada como anteriormente descrito, até os pós terem sido completamente amalgamados no lipogel.

Lipogel: Exemplo 3A

Componentes principais	Função	% (p/p)
HA micronizado		0,2
Componente acessório		
Colagenase liofilizada micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Vidrado de Jojoba LV	Agente viscoso da fase lipofílica	80,0
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

Lipogel: Exemplo 3B

Componentes principais	Função	% (p/p)
HA micronizado		0,2
Componente acessório		
Colagenase liofilizada micronizada		1,5 U/g
Excipientes		
Vidrado de Jojoba LV	Agente viscoso da fase lipofílica	80,0
Óleo de vaselina leve	Fase lipofílica	Qb para 100

As ditas formulações podem conter princípios activos farmacêuticos ou biológicos tais como por exemplo, antibióticos, antivirais, agentes para curar feridas, agentes citostáticos/citotóxicos, fármacos anti-

cancerígenos, hormonas, fármacos anti-inflamatórios esteroides e não esteroides, factores tróficos e citocinas de natureza variada.

Tendo sido a invenção assim descrita é claro que estes processos podem ser modificados de várias maneiras.

Explicações sobre as Figuras

Figura 1: Tempo de digestão do colagénio de 90 minutos
MWS=padrões de peso molecular representados por 6 bandas: 205 kDs, 116kDs, 97 kDs, 66kDs; 45 kDs, 29 kDs; CP=colagénio como tal, controlo positivo; Coll. 1=colagenase a uma concentração de 0,33 U+colagénio; Coll. 2= colagenase a uma concentração de 0,33U; Coll/HA 1=Colagenase a uma concentração de 0,33U+colagénio na presença de HA; Coll./HA 2=colagenase a uma concentração de 0,33 U na presença de HA.

Figura 2: Tempo de digestão do colagénio de 90 minutos
MWS=padrões de peso molecular representados por 6 bandas: 205 kDs, 116 kDs, 97kDs, 66KDs, 45 kDs, 29kDs; CP=colagénio como tal, controlo positivo; Coll. 1=colagenase a uma concentração de 0,66 U+ colagénio; Coll. 2= colagenase a uma concentração de 0,66U; Coll./HA 1=colagenase a uma concentração de 0,66U+colagénio na presença de HA; Coll./HA2= colagenase a uma concentração de 0,66U na presença de HA.

Figura 3: Tempo de digestão do colagénio de 90 minutos
MWS=padrões de peso molecular representados por 6 bandas: 205 kDs, 116 kDs, 97kDs, 66KDs, 45 kDs, 29kDs; CP=colagénio como tal, controlo positivo; Coll. 1=colagenase a uma concentração de 1,32 U+colagénio; Coll. 2= colagenase a uma concentração de 1,32 U; Coll./HA 1=colagenase a uma

concentração de 1,32U+colagénio na presença de HA;
Coll./HA2= colagenase a uma concentração de 1,32U na
presença de HA.

Figura 4: Tempo de digestão do colagénio de 4 horas
MWS=padrões de peso molecular representados por 6 bandas:
205 kDs, 116 kDs, 97kDs, 66kDs, 45 kDs, 29kDs; CP=colagénio
como tal, controlo positivo; Coll. 1=colagenase a uma
concentração de 0,66U+colagénio; Coll. 2= colagenase a uma
concentração de 0,66U; Coll./HA 1=colagenase a uma
concentração de 0,66U+colagénio na presença de HA;
Coll./HA2= colagenase a uma concentração de 0,66U na
presença de HA.

Figura 5: Tempo de digestão do colagénio de 12 horas
MWS=padrões de peso molecular representados por 6 bandas:
205 kDs, 116 kDs, 97kDs, 66kDs, 45 kDs, 29kDs; CP=colagénio
como tal, controlo positivo; Coll. 1=colagenase a uma
concentração de 0,66 U+colagénio; Coll. 2= colagenase a uma
concentração de 0,66U; Coll./HA 1=colagenase a uma
concentração de 0,66U+colagénio na presença de HA;
Coll./HA2= colagenase a uma concentração de 0,66U na
presença de HA.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2010.

Reivindicações

1. Composição para utilização tópica contendo derivados de ácido hialurónico em associação com a enzima proteolítica collagenase, em que os derivados de ácido hialurónico são sais de bases orgânicas e/ou inorgânicas, ésteres, amidas, derivados sulfatados, ésteres internos, derivados desacetilados e percarboxilados.
2. Composição contendo derivados de ácido hialurónico em associação com uma enzima proteolítica collagenase para o tratamento da contractura de Dupuytren e do glaucoma em que os derivados de ácido hialurónico são os seus sais de bases orgânicas e/ou inorgânicas, ésteres, amidas, derivados sulfatados, ésteres internos, derivados desacetilados e percarboxilados.
3. Composição de acordo com as reivindicações 1 e 2, em que a collagenase é produzida a partir do microrganismo não patogénico que pertence à estirpe de *Vibrio Alginolyticus sub. lophagus*.
4. Composição de acordo com as reivindicações 1-3, 4 contendo substâncias activas do ponto de vista farmacológico e/ou biológico.
5. Composição de acordo com as reivindicações 1-3, 4 para o tratamento de queimaduras de vários graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras dos pés de diabéticos e no tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.
6. Composição de acordo com as reivindicações 1-5, em que a concentração da enzima proteolítica collagenase varia entre 0,01U e 100U/ miligramas de derivados de HA.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, em que a concentração da enzima colagenase varia entre 0,1 e 20U/miligramas de derivados de HA.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a concentração da enzima colagenase varia entre 0,2 e 10U/miligramas de derivados de HA.

9. Composição de acordo com as reivindicações 1-8, em que a concentração final de derivados de HA varia entre 0,01 e 5% peso/peso do produto acabado.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que a concentração final de derivados de HA varia entre 0,1 e 2% p/p.

11. Composição de acordo com a reivindicação 9, em que a concentração final de derivados de HA varia entre 0,2 e 0,4% p/p.

12. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações 2-4 e 6-11 para o tratamento da contractura de Dupuytren e do glaucoma.

13. Composições lipofílicas farmacêuticas de acordo com as reivindicações 1-4 e 6-11 contendo maltose e carragenina como agentes estabilizantes.

14. Composições farmacêuticas lipofílicas contendo ácido hialurônico e/ou os seus derivados em associação com a enzima proteolítica colagenase e contendo ainda maltose e carragenina como agentes estabilizantes.

15. Composições farmacêuticas lipofílicas de acordo com as reivindicações 13 ou 14 para o tratamento de queimaduras de diferentes graus, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras dos pés diabéticos e para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

16. Composições farmacêuticas lipofílicas de acordo com a reivindicação 14, em que a collagenase é produzida a partir dos microorganismos não patogénicos que pertencem à estirpe de *Vibrio Alginolyticus sub. lophagus*.

17. Composições farmacêuticas de acordo com a reivindicação 14, em que a concentração da enzima proteolítica collagenase encontra-se na gama de 0,01U e 100U/miligramas de HA e/ou dos seus derivados.

18. Composições lipofílicas farmacêuticas de acordo com a reivindicação 14, em que a concentração final de HA e/ou dos seus derivados varia entre 0,01 e 5% peso/peso do produto acabado.

19. Uso de composições de acordo com as reivindicações 1, 3-4, 6-11 no fabrico de um medicamento para o tratamento de queimaduras de grau variável, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras de pés diabéticos e para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

20. Uso de composições de acordo com as reivindicações 2-4, 6-11 no fabrico de um medicamento para o tratamento da contractura de Dupuytren e do glaucoma.

21. Uso de composições farmacêuticas lipofílicas de acordo com as reivindicações 13-18 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de queimaduras de grau

variável, escaras de pressão, úlceras vasculares e úlceras de pés diabéticos e para o tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides.

22. Uso de composições lipofílicas farmacêuticas de acordo com as reivindicações 13-18 para o fabrico de um medicamento para o tratamento da contractura de Dupuytren e do glaucoma.

23. Processo para a preparação de um lipogel contendo ácido hialurónico e/ou dos seus derivados em associação com a enzima proteolítica collagenase envolvendo os passos seguintes:

- I) preparação de uma collagenase liofilizada com quantidades pré-determinadas de maltose e carragenina;
- II) micronização da dita collagenase liofilizada;
- III) micronização do HA
- IV) preparação da base lipofílica do lipogel;
- V) dispersão homogénea de componentes micronizados na base de lipogel.

Lisboa, 7 de Dezembro de 2010.

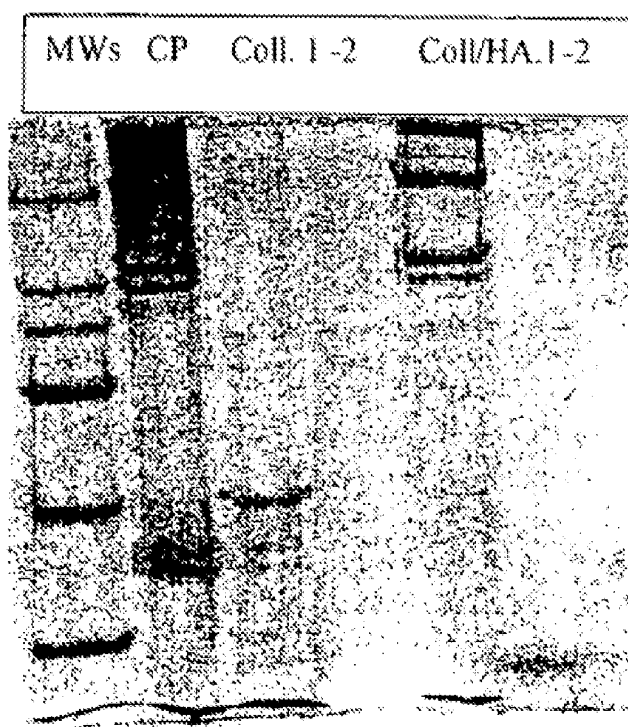


Figura 2

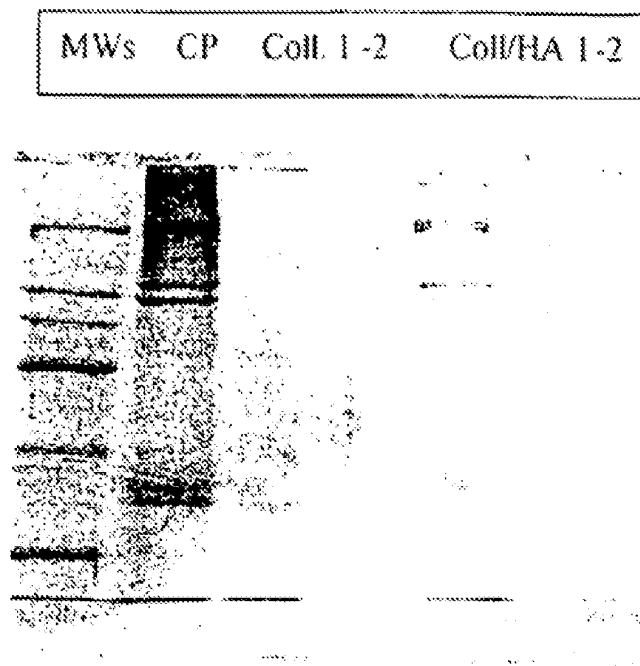


Figura 3

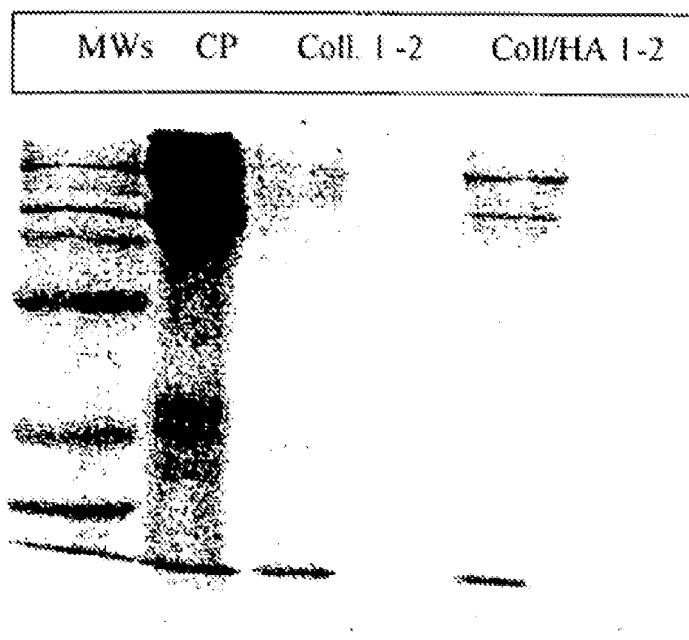


Figura 4

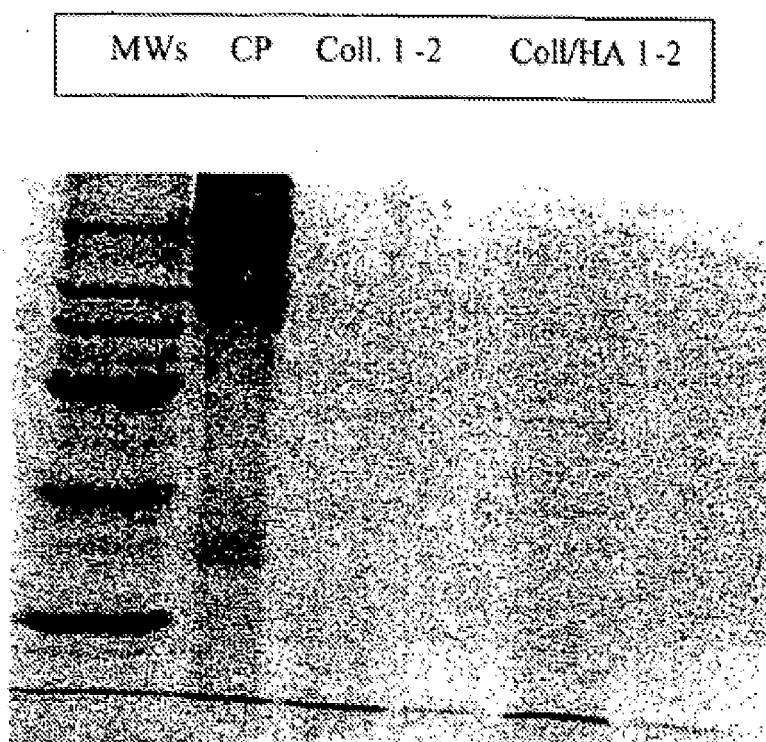


Figura 5