



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 352 350**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 27/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06754678 .8**

(96) Fecha de presentación : **05.07.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1901755**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2008**

(54) Título: **Nuevas composiciones farmacéuticas que contienen ácido hialurónico o sus derivados y colagenasa para el tratamiento de heridas, quemaduras y úlceras.**

(30) Prioridad: **07.07.2005 IT PD05A0207**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.02.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.02.2011

(73) Titular/es: **FIDIA FARMACEUTICI S.p.A.**
Via Ponte della Fabbrica 3-A
35031 Abano Terme, Padova, IT

(72) Inventor/es: **Caruso, Salvatore;**
Gennari, Giovanni;
Vaccaro, Susanna;
Callegaro, Lanfranco y
Giannelli, Antonio

(74) Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

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

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas composiciones que contienen derivados del ácido hialurónico junto con la enzima proteolítica colagenasa (y formulaciones farmacéuticas afines) para la preparación de un apósito para el tratamiento tópico de diversos tipos de heridas, quemaduras de profundidad variable, llagas por presión, úlceras vasculares y úlceras diabéticas del pie, así como para el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El desbridamiento enzimático de tejido necrótico implica la eliminación de dicho tejido mediante la acción de las enzimas inocuas que son capaces de degradar el colágeno desnaturalizado, la fibrina y la elastina presentes en el tejido desvitalizado, conservando el tejido viable.

Esta técnica resulta preferida a la terapia mecánica/quirúrgica, porque es más selectiva hacia el tejido de granulación y es especialmente adecuada en las lesiones no infectadas, tales como úlceras en la piel de etiología diversa y de profundidad variable.

Las formulaciones enzimáticas comercializadas en la actualidad contienen la enzima proteolítica colagenasa (Noruxol[®] e Iruxol[®]) o están constituidas por una asociación de fibrinolisisina y desoxirribonucleasa (Elase[®]), que son eficaces en su totalidad (aunque con resultados diferentes) para la eliminación del tejido necrótico, exudado purulento y fibrina (Mekkes J.R., *Arch. Dermatol. Rese.*, 1998, 290:152 -157).

De gran interés desde el punto de vista de su aplicación son las colagenasas producidas por bacterias de la especie *Clostridium*, aunque la colagenasa producido a partir de *Vibrio alginolyticus* (*Achromobacter colagenase* EC 3.4.24.08; Borivoj K., *Matrix Supplement*, 1992, 1: 127-133; documento EP0115974 B1) producida a partir de una cepa no patógena con una actividad específica que es notablemente superior a la de la enzima producida a partir de *Clostridium*, se ha descrito ampliamente y caracterizado (aunque aún no está comercializada).

La colagenasa es una proteína que es muy inestable en soluciones acuosas,

incluso a bajas temperaturas. Por otra parte, puede ser fácilmente desnaturalizada por los agentes quelantes y varios iones metálicos que puede interactuar con el ión calcio que es esencial para la actividad enzimática de la molécula.

Es una enzima que es extremadamente sensible a los procedimientos químico-físicos, tales como la congelación, descongelación, liofilización y secado, procesos que a menudo son necesarios en el curso de la preparación final de formulaciones farmacéuticas.

Se han probado diversas formulaciones para encontrar una composición final que contiene una colagenasa estable, y por lo tanto activa, (EP0543521B1, solicitud de patente WO 96/41870, WO 93/00807, WO 94/24273).

Aunque todavía en fase experimental, la enzima se utiliza en forma inyectable para tratar la contractura de Dupuytren, una dolencia que deforma los dedos, mientras que la utilización de la colagenasa es particularmente importante en la reducción del glaucoma, trastorno que causa una presión excesiva en el ojo con posibles daños en el nervio óptico, unido a un depósito anormal de colágeno dentro del conducto que drena los líquidos biológicos de la cámara anterior del ojo.

La enzima colagenasa se ha manifestado principalmente en el desbridamiento de quemaduras de profundidad variable, en las llagas por presión, en las úlceras vasculares y en las úlceras diabéticas del pie. Por otra parte, se utiliza para tratar cicatrices hipertróficas y queloides.

La adecuada cicatrización de la herida requiere una fase reepitelización adecuada, que sigue a la fase que implica la eliminación de la escara, posiblemente mediante desbridamiento quirúrgico y/o enzimático.

El colágeno es el principal componente del tejido necrótico y, por consiguiente, es de fundamental importancia para retirarlo a fin de favorecer la reepitelización de la herida. Sin embargo, en el curso de esta operación es necesario para proteger la piel de alrededor para evitar dolorosos fenómenos irritativos que resultan de la utilización de la colagenasa, ya que la enzima es capaz de degradar el colágeno desnaturalizado y natural, hidrolizar los enlaces peptídicos de la cadena de aminoácidos.

Durante el desbridamiento enzimático de la zona de la herida que se está tratando no disminuye de tamaño, puede incluso aumentar. Por lo tanto, cuando se ha retirado la escara, el tejido de granulación recién formado está expuesto y por consiguiente abierto a peligrosas infecciones bacterianas que pueden poner en peligro la curación completa de la

lesión.

El proceso de cicatrización de las heridas es un fenómeno complejo que involucra muchos tipos de factores celulares y humorales, y muchas fases que pueden favorecer la formación de cicatrices patológicas, como las escaras hipertróficas y queloides.

5 La curación adecuada por consiguiente requiere la aplicación de fármacos para guiar (y acelerar) el proceso de cicatrización de heridas.

La bibliografía científica y de patentes contiene amplias descripciones y reivindicaciones que nombran al ácido hialurónico (AH) como el factor principal en los procesos de regeneración de tejidos (solicitud de patente europea EP1196179).

10 De hecho, gracias a sus especiales características físico-químicas y biológicas, el ácido hialurónico participa y modula todas las principales fases sucesivas de la cicatrización de heridas:

- inflamación;
- 15 • formación de tejido de granulación;
- reepitelización;
- remodelación de la cicatriz.

20 Debido a sus propiedades físico-químicas, dicho polisacárido controla la hidratación de los tejidos, creando el microclima necesario para la rápida cicatrización; además, su alta viscosidad protege la herida de posibles infecciones bacterianas y/o víricas.

25 Gracias a sus propiedades biológicas, el ácido hialurónico ha demostrado su eficacia en la protección contra los radicales libres, al controlar los procesos inflamatorios y estimular la angiogenesis. Se ha demostrado su función en el control de la expresión de citocinas y factores tróficos, y en la estabilización del tejido de granulación, favoreciendo y regulando el flujo de los fibroblastos y las células endoteliales en la herida durante reepitelización.

30 Por último, los datos experimentales han demostrado la implicación de ácido hialurónico en el control de la proliferación de queratinocitos y el depósito de colágeno en la herida, reduciendo la formación de tejido fibrótico y, por tanto, de cicatrización patológica (John Chen W.Y. *et al.*, Wound Repair and Regeneration , 1999, 7:79-89).

El AH es un heteropolisacárido compuesto por restos alternos de ácido D-

glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. Es un polímero de cadena lineal con un peso molecular comprendido en el intervalo de 50.000 a 13×10^6 Da, de acuerdo con la fuente de la que se obtiene y de los procedimientos utilizados para prepararlo.

Está presente en la naturaleza en los geles pericelulares, la sustancia fundamental del tejido conectivo en los organismos vertebrados (de los que representa uno de los componentes principales), en el líquido sinovial de las articulaciones, en el humor vítreo y el cordón umbilical.

AH por tanto, desempeña una función importante en el organismo biológico (además de los descritos anteriormente), como soporte mecánico para las células de muchos tejidos, como la piel, tendones, músculos y cartílago.

Dicho polisacárido es conocido por ser utilizado como vehículo para fármacos de varios tipos, en las asociaciones simples o salificado con ácido hialurónico, ya que sus propiedades especiales de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no inmunogenicidad, viscosidad e hidratabilidad le hacen especialmente adecuado como un sistema de liberación de fármacos y moléculas tanto a nivel tópico como general (documentos EP0197718B1, EP0445255B1).

De hecho, los experimentos preclínicos con AH asociado a antiinflamatorios (como Diclofenaco) para uso tópico han demostrado que el AH aumenta de manera significativa (en comparación con las referencias) la absorción del fármaco en la piel donde, gracias a la acción específica de ácido hialurónico, se compartimenta para formar un "depósito", lo que minimiza aún más la absorción por la piel. La acción del fármaco (y su eficacia) aumenta de este modo de manera significativa (Brown M.B. *et al.* JEADV, 2005, 19:309-318).

El documento EP0637450 trata de una composición farmacéutica inyectable para el tratamiento de cicatrices que comprende ácido hialurónico y colagenasa, en tanto que Rafanelli *et al.* en el artículo "Clinical Study of hyaluronic acid activity in ulcerations of the lower extremities" *Chronica dermatologica*, 1986, Vol. 17, nº 2, páginas 251-258 evalúa la función del ácido hialurónico por sí mismo o con respecto a CAF-colagenasa por su actividad en la reparación de las extremidades inferiores ulceradas.

En contra de la descripción anterior de AH como sistema de suministro, se ha descubierto sorprendentemente que una asociación entre el AH y/o derivados del mismo con la enzima colagenasa determina una clara reducción en la actividad de la enzima, lo que permite de este modo la degradación o eliminación de la escara con formación

simultánea de tejido de granulación, gracias a la acción específica del AH.

Por otra parte, dicho polisacárido protege el tejido sano que rodea la lesión de la acción digestiva de la colagenasa, aumentando así la observancia del paciente para el producto.

5 Al reducir la actividad proteolítica de la colagenasa, el ácido hialurónico manifiesta propiedades que resultan ser la antítesis absoluta de las del sistema de suministro descrito anteriormente, como conoce cualquier experto en la materia.

Otro objeto de la presente invención está representado por las formulaciones farmacéuticas de carácter lipófilo, que contienen colagenasa junto con AH, lo que permite
10 la estabilización completa de la enzima y, por tanto, su mantenimiento en una forma activa, a temperatura ambiente durante períodos prolongados de tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La presente invención describe y reivindica la asociación de AH y/o derivados de los mismos con la enzima colagenasa en formulaciones farmacéuticas de carácter lipófilo que, gracias a la presencia de excipientes y estabilizadores especiales, permiten que la enzima proteolítica permanezca estable a temperatura ambiente durante períodos prolongados de tiempo.

20 Gracias a las propiedades especiales de AH en la regeneración de tejidos, el desbridamiento enzimático por la nueva composición enzima/AH modifica sustancialmente las fases de eliminación de la escara y la regeneración de nuevo tejido que normalmente sigue al tratamiento con colagenasa sola, permitiendo el establecimiento de nuevas fases que determinan la correcta cicatrización de la herida sin la formación de cicatrices
25 patológicas:

- la degradación o eliminación de la escara se produce al mismo tiempo que la formación de tejido de granulación;
- la formación de nuevo tejido conectivo determina una reducción en el tamaño
30 de la herida después de la eliminación de la escara (por las razones expuestas anteriormente) y, por tanto, una disminución significativa en el riesgo de infecciones bacterianas y/o víricas;
- el tejido sano circundante está protegido de la acción digestiva de la

colagenasa, gracias al AH;

- la eliminación de la escara se puede realizar sin dolor.

Las reivindicaciones de las nuevas formulaciones de colagenasa/AH descritas anteriormente son posibles porque AH ha demostrado ser capaz de modular la actividad proteolítica de la colagenasa disminuyendo significativamente su acción durante el desbridamiento enzimático del tejido necrótico, como se demuestra más adelante.

La formulación de enzima/AH está especialmente indicada en el desbridamiento de quemaduras de profundidad variable, llagas por presión, úlceras vasculares, úlceras diabéticas del pie, heridas de diversa naturaleza y de diferentes tamaños y profundidad y, por otra parte, en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides con la observancia final del paciente con el producto que es decididamente mayor que con la enzima solo.

Además, dicha composición también se reivindica en el tratamiento de la contractura de Dupuytren y en el glaucoma.

Los derivados del AH que se pueden utilizar en las nuevas formulaciones que son objeto de la presente invención son las siguientes:

1. AH salificado con bases orgánicas y/o inorgánicas con un peso molecular de 50 a 730 kDa (EP0138572 B1) o con un alto peso molecular de 750-1.230 kDa, (patente EP 535.200 B1);

2. Hyaff®: ésteres de AH con alcoholes de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica o heterocíclica, con un porcentaje de esterificación que pueden variar según el tipo y la longitud del alcohol utilizado, entre el 1 y el 100%, preferentemente entre 50 y 75% (patente EP 216.453 B1);

3. Hyadd™: amidas de AH con aminas de la serie alifática, aralifática, cicloalifática, aromática, cíclica y heterocíclica, con un porcentaje de amidación de entre 1 y 10%, preferentemente de 4% (patente EP 1095064 B1);

4. derivados O-sulfatados de AH hasta el 4º grado de sulfatación (patente EP 0702699 B1);

5. ACP®: ésteres internos de AH con un porcentaje de esterificación interna entre el 0,5 y el 10% y preferentemente 5% (patente EP 0341745 B1);

6. derivados desacetilados de AH: derivados de la desacetilación de la fracción de N-acetil-glucosamina con un porcentaje de desacetilación preferentemente entre 0,1 y

30%, mientras que todos los grupos carboxilo de la AH puede salificarse con orgánicos y/o bases inorgánicas (patente EP1313772 B1);

7. Hyoxx™: derivados percarboxilados de AH obtenidos a partir de la oxidación del hidroxilo primario de la fracción de N-acetil-glucosamina con un grado de percarboxilación de entre 0,1 y 100% y, preferentemente, entre el 25 y el 75%. Todos los grupos carboxilo del AH pueden salificarse con bases orgánicas y/o inorgánicas (solicitud de patente EP1339753).

El AH utilizado en la invención como tal o en la preparación de sus derivados puede proceder de cualquier fuente, por ejemplo, puede obtenerse por extracción de las crestas de gallo (patente EP0138572 B1), por fermentación, o por medios tecnológicos y su peso molecular puede variar entre 400 y 3×10^6 Da, en particular entre 1×10^5 Da y 1×10^6 Da, y más concretamente todavía entre 50.000 y 200.000 Da.

La concentración de la enzima colagenasa que ha de utilizarse en asociación con ácido hialurónico o sus derivados puede estar comprendida entre 0,01 U y 100 U/mg de AH, preferentemente entre 0,1 y 20 U y aún más preferentemente entre 0,2 y 10 U/mg de AH.

La concentración final de ácido hialurónico o derivados de los mismos en la composición farmacéutica final puede estar comprendida entre 0,01 y 5% peso/peso del producto final, oscilando preferentemente entre 0,1 y 2% p/p, y aún más preferentemente entre 0,2 y 0,4% p/p.

Una unidad de la colagenasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 nmol de PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg en un segundo a pH igual a 7,1 y a 37°C (PZ = 4-fenil-azobenciloxicarbonilo) (Wunsch et al., *Physiol. Chem.*, 1963, 333 :149-151).

La colagenasa preferentemente utilizada o para ser utilizada en las composiciones que son objeto de la presente invención es la producida a partir de los microorganismos no patógenos pertenecientes a la cepa *Vibrio alginolyticus sub. lophagus*, NCIMB (National Collection of Industrial and Marine Bacteria), cepa número 11038, cepa equivalente: LMG 3418.

Es un microorganismo gram negativo que produce una colagenasa con un peso molecular de 90.000 a 110.000 Daltons (nomenclatura IUBMB: EC 3.4.24.3), estable en un intervalo de pH entre 4,0 y 11,0, pero con un pH óptimo entre 6,0 y 8,0, estable a temperaturas que oscilan entre 4 y 40°C con una temperatura óptima de 37°C.

La enzima se define como una metalendopeptidasa porque rompe el colágeno en

fragmentos peptídicos, que actúan directamente sobre la estructura de la proteína de triple cadena. Las sales de plata y cobre inhiben la actividad específica de la enzima, así como los agentes quelantes tal como el EDTA, que se une a los iones de calcio necesarios para la actividad de la colagenasa.

5

Actividad colagenolítica de la colagenasa de *Vibrio alginolyticus* frente a la actividad de la misma enzima asociada al ácido hialurónico

El objetivo del estudio consistió en comparar la actividad de la enzima, como tal, la de la nueva composición de la colagenasa/AH, para observar la influencia del ácido hialurónico en la actividad proteolítica de la misma enzima.

10

Material:

- 15 • colágeno extraído de la piel de bovino a una concentración de 1 mg/ml (de tampón preparado como se describe más adelante) como sustrato para la actividad enzimática;
- colagenasa extraída de *Vibrio alginolyticus* probada a tres diferentes concentraciones de 0,33, 0,66 y 1,32 unidades enzimáticas;
- 20 • colagenasa extraída de *Vibrio alginolyticus* probada a las mismas tres concentraciones de 0,33, 0,66 y 1,32 U, pero en asociación con ácido hialurónico en las siguientes proporciones: 0,16 U/mg de AH, 0,33 U o 0,66 U/mg de AH (por lo tanto, 0,33, 0,66 y 1,32 U se asocian a 2 mg de AH). En los tres casos, la concentración del polisacárido se mantuvo constante.

25

Método de digestión enzimática:

El proceso de degradación del colágeno se realizó a 37°C durante un período de tiempo fijado inicialmente en 90 minutos. Posteriormente, se repitió el proceso en las mismas concentraciones y a la misma temperatura, pero la reacción se interrumpió 4 y 12 horas después de comenzada.

30

La reacción de digestión se produjo en tampón Tris-HCL, 0,05 M, con un contenido de CaCl_2 0,01 M a pH = 7,4 al que se había añadido el sustrato de reacción, ya sea la

propia colagenasa o la enzima asociada a la serie de concentraciones de AH como se describió anteriormente.

Resultados

5

10

15

La mezcla de digestión enzimática obtenida (enzima y productos relativos de degradación del colágeno) se analizó en gel de poliacrilamida al 7% (electroforesis: SDS-PAGE; Laemmli UK, *Nature*, 1970, 680-685), para asociar los diversos fragmentos de proteína separados de acuerdo con su peso molecular (P.M.) y se tiñeron con azul Comassie. Después de realizar la electroforesis, el colágeno se separa en subunidades con un peso molecular de aproximadamente 100.000 Daltons con más fragmentos peptídicos con un P.M. de 33.000 Daltons. Todos los geles se cargaron con patrones de peso molecular, con el colágeno no digerido como referencia positiva, con el colágeno degradado por colagenasa como tal y la enzima afín cargada por separado y, por último, con el colágeno degradado por la colagenasa asociada a AH y la enzima sola.

20

La figura 1 demuestra claramente que las enzimas 0,33 U degradan sólo parcialmente el colágeno en 90 minutos, pero, sobre todo, que la presencia de AH en la composición colagenasa/AH (a la misma concentración de la enzima) modifica la acción colagenolítica de la enzima, lo que reduce su actividad.

25

Las figuras 2 y 3 muestran, además, la acción moduladora ejercida por el ácido hialurónico en la enzima: después de 90 minutos 0,66 y 1,32 U de colagenasa degradan completamente el colágeno, mientras que, especialmente a 0,66 U, AH ralentiza la acción de colagenolítica la enzima. La influencia de dicho polisacárido sobre la enzima es aún más evidente con 1,32 U de la colagenasa.

30

Las figuras 4 y 5 muestran la situación después de 4 y 12 horas: después de 4 horas de incubación de la enzima (0,66 U) con el colágeno es todavía posible observar la acción de AH sobre la colagenasa debido a que las fracciones de proteína no digerida de colágeno son visibles, aunque débilmente, después de 12 horas (de nuevo con 0,66 U de enzima) la acción moduladora del polisacárido ya no es evidente y el colágeno se degrada por completo.

Se proporcionan a continuación algunos ejemplos descriptivos y no limitativos de cómo se pueden preparar las nuevas formulaciones que son objeto de la presente invención:

Método de producción de colagenasa/lipogel AHPreparación de los componentes funcionales del lipogel:

5 Una solución acuosa inicial o una solución tampón a pH 7,1 (Tris.HCl 25 mM, CaCl₂ 10 mM) se prepara con 82,7 U/ml de colagenasa, 45 ml de esta solución se liofiliza con los siguientes excipientes: maltosa (18 g) como diluyente/estabilizador, carragenina, posiblemente purificada (0,54 g) como estabilizador y 45 g de agua. Se obtienen 18,6 g de producto liofilizado (materia seca), integrado de la siguiente manera:

10

- 95% de maltosa p/p
- 2,8% de carragenina p/p
- 0,9% de colagenasa p/p

15

El producto liofilizado se microniza a continuación.

Al mismo tiempo, se microniza también el AH obtenido por fermentación y con un peso molecular de 160 kDa.

20

Dispersión de los componentes funcionales en la base lipófila:Ejemplos 1 y 2

25 La enzima colagenasa y el AH preparado como se describe anteriormente están distribuidos uniformemente en una base lipófila constituida por los siguientes excipientes:

- aceite de ricino hidrogenado en forma de polvo (con acción gelificante)
- alcohol cetilestearílico (como agente de consistencia)
- vaselina filante (como fase lipófila)
- 30 • aceite de vaselina ligero (como fase lipófila)

Preparación de la base lipófila: disolver y solubilizar a aproximadamente 88 a 90°C, la vaselina filante y el alcohol cetilestearílico en el aceite de vaselina. Una vez se ha

obtenido una masa suave y derretida, se disuelve y solubiliza el aceite de ricino hidrogenado en polvo en la fase lipófila recién formada.

Una vez la masa está bien derretida, se enfría entre 25 y 30°C.

5 Lipogel: Ejemplo 1 A

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	5,0
Vaselina filante	Fase lipófila	36,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Lipogel: Ejemplo 1 B

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,5 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	5,0
Vaselina filante	Fase lipófila	36,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Lipogel: Ejemplo 1 C

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		1
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	5,0
Vaselina filante	Fase lipófila	36,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Lipogel: Ejemplo 1 D

5

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
HYAFF micronizado (50% esterificado con alcohol bencílico)		0,2
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	5,0
Vaselina filante	Fase lipófila	34,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Lipogel: Ejemplo 2 A

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	10,0
Vaselina filante	Fase lipófila	36,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Lipogel: Ejemplo 2 B

5

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Colagenasa liofilizada y micronizada		2 U/g
Excipientes		
Aceite de ricino hidrogenado	Agente gelificante	1,0
Alcohol cetilestearílico	Agente de consistencia	10,0
Vaselina filante	Fase lipófila	34,5
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Dispersión de los componentes funcionales en la base lipófila:Ejemplo 3

- 5 Incorporar y disolver aceite de vaselina ligero en jojoba helada, mientras se agita lentamente a 70-75°C (s sistema gelificante lipófilo a base de copolímeros de estireno-propileno-butileno en el aceite de jojoba) hasta obtener una masa suave. Enfriar a temperatura ambiente y luego añadir, en agitación, AH micronizado y colagenasa lipófila micronizada, como se describió anteriormente, hasta que los polvos se han amalgamado
- 10 totalmente en el lipogel.

Lipogel: Ejemplo 3 A

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Componente accesorio		
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,8 U/g
Excipientes		
Jojoba cristalizada LV	Agente viscoso en fase lipófila	80,0
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

15 Lipogel: Ejemplo 3 B

Principales componentes	Función	% p/p (peso/peso)
AH micronizado		0,2
Componente accesorio		
Colagenasa liofilizada y micronizada		1,5 U/g
Excipientes		
Jojoba cristalizada LV	Agente viscoso en fase lipófila	80,0
Aceite ligero de vaselina	Fase lipófila	c.s.p. 100

Dichas formulaciones pueden contener sustancias farmacológica y/o biológicamente activas tales como, por ejemplo, antibióticos, antivíricos, cicatrizantes de heridas, agentes citostáticos y citotóxicos, fármacos contra el cáncer, hormonas, fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, factores tróficos y las citocinas de diversa naturaleza.

A partir de la descripción de la invención, resulta evidente que pueden introducirse diversas modificaciones en estos procedimientos.

Explicaciones de las figuras

Figura 1: Tiempo de digestión del colágeno de 90 minutos

MWS = patrones de peso molecular representados por 6 bandas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa y 29 kDa;

CP = colágeno como tal, referencia positiva; Coll. 1 = colagenasa a una concentración de 0,33 U + colágeno; Coll. 2 = colagenasa a una concentración de 0,33 U; Coll. /AH 1 = colagenasa a una concentración de 0,33 U + colágeno en presencia de AH; Coll. /AH 2 = Colagenasa a una concentración de 0,33 U en presencia de AH.

Figura 2: Tiempo de digestión del colágeno de 90 minutos

MWS = patrones de peso molecular representados por seis bandas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa; CP = Colágeno como tal, control positivo; Coll. 1 = colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno; Coll. 2 = colagenasa a una concentración de 0,66 U; Coll. /AH 1 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno en presencia de AH; Coll. /AH 2 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U en presencia de AH.

Figura 3: Tiempo de digestión del colágeno de 90 minutos

MWS = patrones de peso molecular representados por seis bandas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa; CP = Colágeno como tal, referencia positiva; Coll.

1 = Colagenasa a una concentración de 1,32 U + colágeno; Coll. 2 = Colagenasa a una concentración de 1,32 U; Coll. /AH 1 = Colagenasa a una concentración de 1,32 U + colágeno en la presencia de AH; Coll. /AH 2 = Colagenasa a una concentración de 1,32 U en presencia de AH.

5

Figura 4: Tiempo de digestión del colágeno de 4 horas

MWS = patrones de peso molecular representado por seis bandas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa; CP = Colágeno como tal, referencia positiva; Coll. 1 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno; Coll. 2 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U; Coll. /AH 1 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno en presencia de AH; Coll. /AH 2 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U en la presencia de AH

10

15

Figura 5: Tiempo de digestión del colágeno de 12 horas

MWS = patrones de peso molecular representado por seis bandas: 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa y 29 kDa; CP = Colágeno como tal, referencia positiva; Coll. 1 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno; Coll. 2 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U; Coll. /AH 1 = Colagenasa a una concentración de 0,66 U + colágeno en presencia de AH; Coll. /AH 2 = Colagenasa 2 a una concentración de 0,66 U en presencia de AH.

20

REIVINDICACIONES

1. Composición para uso tópico que contiene derivados del ácido hialurónico junto con la enzima proteolítica collagenasa, en la que los derivados del ácido hialurónico son sus sales con bases orgánicas y/o inorgánicas, ésteres, amidas, derivados sulfatados, ésteres internos, derivados desacetilados y percarboxilados.

2. Composición que contiene derivados del ácido hialurónico junto con la enzima proteolítica collagenasa para el tratamiento de la contractura de Dupuytren y el glaucoma en la que los derivados del ácido hialurónico son sus sales con bases orgánicas y/o inorgánicas, ésteres, amidas, derivados sulfatados, ésteres internos, derivados desacetilados y percarboxilados.

3. Composición según las reivindicaciones 1 y 2 en la que la collagenasa se produce a partir del microorganismo no patógeno que pertenece a la cepa *Vibrio Alginolyticus sub. lophagus*.

4. Composición según las reivindicaciones 1 a 3, que contiene sustancias farmacológicamente y/o biológicamente activas.

5. Composición según las reivindicaciones 1 y 3 a 4, en el tratamiento de quemaduras de profundidad variable, llagas por presión, úlceras vasculares y úlceras diabéticas del pie y en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides.

6. Composición según las reivindicaciones 1 a 5, en la que la concentración de la enzima collagenasa proteolítica está comprendida entre 0,01 U y 100 U/miligramos de derivados de AH.

7. Composición según la reivindicación 6, en la que la concentración de la enzima collagenasa está comprendida entre 0,1 y 20 U/miligramos de derivados de AH.

8. Composición según la reivindicación 7, en la que la concentración de la enzima collagenasa está comprendida entre 0,2 y 10 U/miligramos de derivados de AH.

9. Composición según las reivindicaciones 1 a 8, en la que la concentración final de derivados de AH está comprendida entre 0,01 y 5% peso/peso del producto acabado.

5 10. Composición según la reivindicación 9, en la que la concentración final de los derivados de AH está comprendida entre 0,1 y 2% p/p.

11. Composición según la reivindicación 9, en la que la concentración final de los derivados de AH está comprendida entre 0,2 y 0,4% p/p.

10 12. Composiciones farmacéuticas según las reivindicaciones 2 a 4 y 6 a 11 para el tratamiento de la contractura de Dupuytren y el glaucoma.

15 13. Composiciones farmacéuticas lipófilas según la reivindicación 1 a 4 y 6 a 11 que contienen maltosa y carragenina como agentes estabilizantes.

14. Composiciones farmacéuticas lipófilas que contienen ácido hialurónico y/o sus derivados junto con la enzima colagenasa proteolítica y que contienen además maltosa y carragenina como agentes estabilizantes.

20 15. Composiciones farmacéuticas lipófilas según la reivindicación 13 ó 14 para el tratamiento de quemaduras de profundidad variable, llagas por presión, úlceras vasculares y úlceras diabéticas del pie y en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides.

25 16. Composiciones farmacéuticas lipófilas según la reivindicación 14, en las que la colagenasa se produce a partir del microorganismo no patógeno que pertenece a la cepa *Vibrio Alginolyticus sub. lophagus*.

30 17. Composiciones farmacéuticas lipófilas según la reivindicación 14, en las que la concentración de la enzima proteolítica colagenasa está comprendida entre 0,01 U y 100 U/miligramos de AH y/o de sus derivados.

18. Composiciones farmacéuticas lipófilas según la reivindicación 14, en la que la

concentración final de AH y/o de sus derivados está comprendida entre 0,01 y 5% peso/peso del producto acabado.

5 19. Utilización de composiciones según las reivindicaciones 1, 3 a 4, 6 a 11 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de quemaduras de profundidad variable, de llagas por presión, de úlceras vasculares y de úlceras diabéticas del pie y en el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides.

10 20. Utilización de composiciones según las reivindicaciones 2 a 4 y 6 a 11 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la contractura de Dupuytren y del glaucoma.

15 21. Utilización de composiciones farmacéuticas lipófilas según las reivindicaciones 13 a 18 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de quemaduras de profundidad variable, de llagas por presión, de úlceras vasculares y de úlceras diabéticas del pie y para el tratamiento de cicatrices hipertróficas y queloides.

20 22. Utilización de composiciones farmacéuticas lipófilas según las reivindicaciones 13 a 18 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la contractura de Dupuytren y del glaucoma.

25 23. Procedimiento para la preparación de un Lipogel que contiene ácido hialurónico y/o sus derivados junto con la enzima proteolítica collagenasa, que implica las etapas siguientes:

- 30
- I) preparación de la collagenasa liofilizada con cantidades fijadas de maltosa y carragenina;
 - II) micronización de dicha collagenasa liofilizada;
 - III) micronización del AH;
 - IV) preparación de la base lipófila de lipogel;
 - V) dispersión suave de los componentes micronizados en la base de lipogel.

1/3

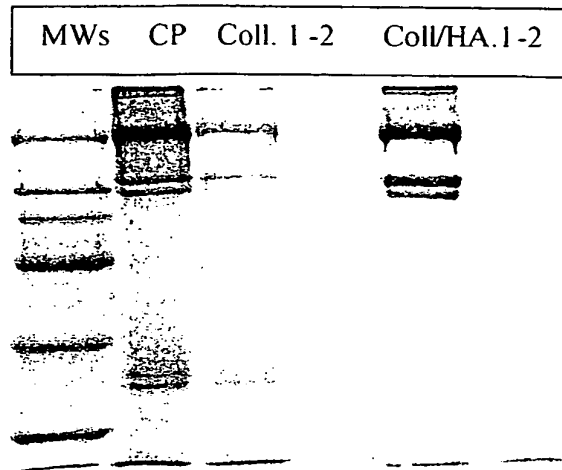


Fig. 1

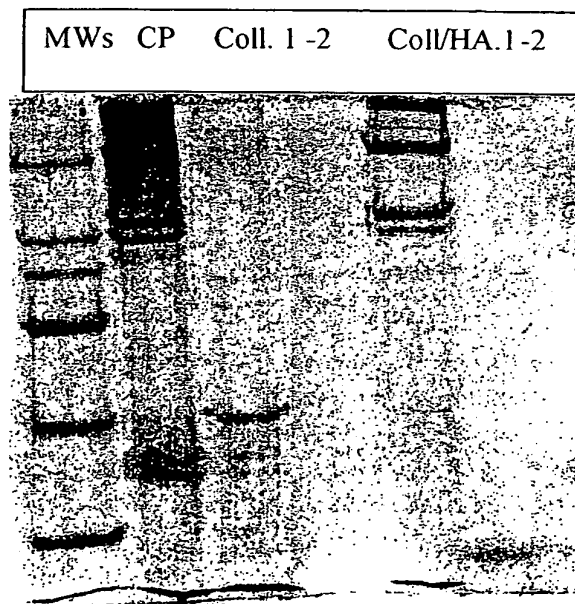


Fig. 2

2/3

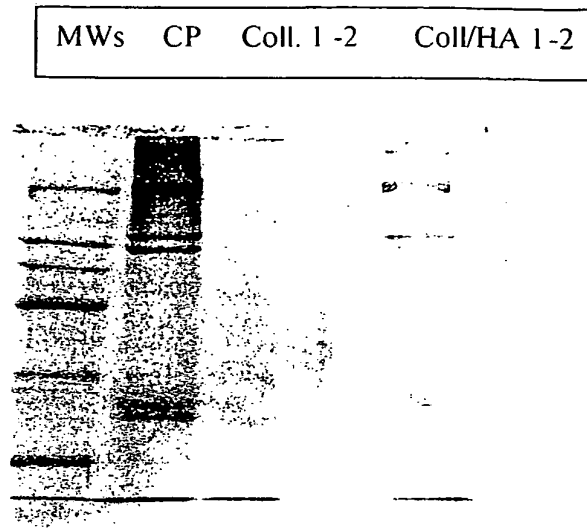


Fig. 3

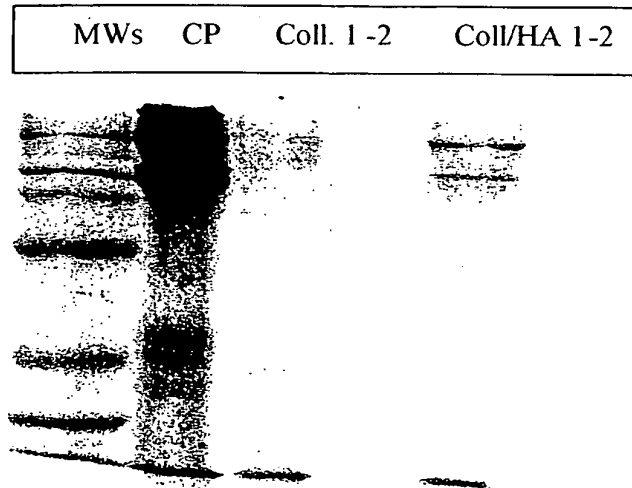


Fig. 4

3/3

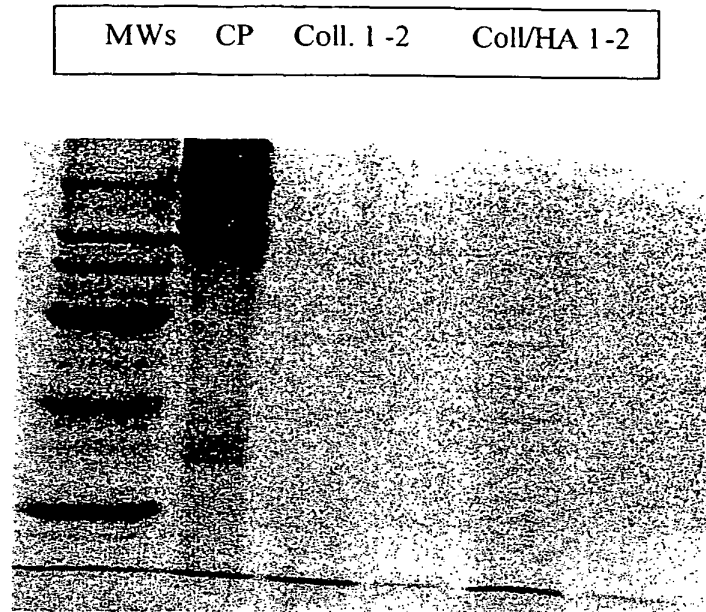


Fig. 5