



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2621520 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.04.27
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.11.05
(86)	Europeisk søknadsnr	11773677.7
(86)	Europeisk innleveringsdag	2011.09.30
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.08.07
(30)	Prioritet	2010.09.30, ES, 201001255
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	BA ME
(73)	Innehaver	Proteos Biotech S.L.U., C/ Almansa 14, 02006 Albacete, ES-Spania
(72)	Oppfinner	MUÑOZ MONTANO, Juan Ramon, C/ Gran Via 624° Izda., E-28013 Madrid, ES-Spania
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	KOLLAGENASE G- OG KOLLAGENASE H-SAMMENSETNINGER FOR BEHANDLING AV SYKDOMMER SOM INVOLVERER KOLLAGENENDRINGER
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A2- 1 932 536 , WO-A2-2007/089851, US-A- 5 989 888 TATSUYA KIN ET AL: "Detrimental effect of excessive collagenase class II on human islet isolation outcome", TRANSPLANT INTERNATIONAL, vol. 21, no. 11, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 1059-1065, XP055012776, ISSN: 0934-0874, DOI: 10.1111/j.1432-2277.2008.00734.x Roche: "Liberase Research Grade Purified Enzyme Blends", Roche Applied Science Product , March 2011 (2011-03), 22 November 2011 (2011-11-22), pages 1-18, XP002664165, Retrieved from the Internet: URL:https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/05401119001_en_04.pdf [retrieved on 2011-11-22] LEE F ET AL: "An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 134, no. 3, 19 March 2009 (2009-03-19), pages 186-193, XP026049514, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2008.11.028 [retrieved on 2008-12-07] Hurst: "Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture", The New England journal of medicine, 3 September 2009 (2009-09-03), XP055012764, Retrieved from the Internet: URL:http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa0810866 [retrieved on 2011-11-22] GERALD H. JORDAN: "The Use of Intralesional Clostridial Collagenase Injection Therapy for Peyronie's Disease: A Prospective, Single-Center, Non-Placebo-Controlled Study", JOURNAL OF SEXUAL MEDICINE, vol. 5, no. 1, 19 December 2007 (2007-12-19), pages 180-187, XP055012848, ISSN: 1743-6095, DOI: 10.1111/j.1743-6109.2007.00651.x

KOLLAGENASE G- OG KOLLAGENASE H-SAMMENSETNINGER FOR BEHANDLING AV SYKDOMMER SOM INVOLVERER KOLLAGENENDRINGER

[0001] Følgende oppfinnelse dekker feltene molekylær biologi, bioteknologi og medisin og er forbundet med anvendelse av kollagenase G og kollagenase H for behandling av sykdommer som involverer kollagenendringer, og formuleringer som inneholder slike enzymer. Den vedrører særlig anvendelse av disse to enzymene i et forhold mellom kollagenase G og kollagenase H på 1:2,5 og 1:3,5, foretrukket 1:3 og dens suksessive anvendelse, hvor kollagenase G administreres først og deretter kollagenase H, eller i en samtidig anvendelse med et system for kontrollert frisetting basert på en hylauronsyregel.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

[0002] Kollagen er den viktigste strukturelle komponenten hos pattedyr og utgjør en stor andel av det totale proteininnholdet i huden og andre kroppsområder. En rekke traumehendelser i huden, slik som forbrenninger, kirurgi, infeksjoner og uhell, er ofte karakterisert ved en unormal akkumulering av fibrøst vev rikt på kollagen og ved et høyt innhold av proteoglykaner. I tillegg til å reparere normalt vev som er blitt ødelagt eller skadet, akkumulerer kollagen også unormalt dannende fiber, arr og tråder som under visse betingelser kan forårsake visse misdannelser (kontrakturer, retraktable arr). Overskytende kollagen er blitt tilskrevet en ubalanse mellom syntese og degradasjon av kollagen.

[0003] En rekke sykdommer og patologier er assosiert med avsetninger av overskytende kollagen og unormal akkumulering av fibrøst vev rikt på kollagen. Slike sykdommer og patologiske tilstander er sammen blitt kalt «sykdommer som involverer kollagenendringer». Kollagenaser er blitt anvendt for å behandle slike forstyrrelser som involverer kollagenendringer.

[0004] Kollagenaser er proteolytiske enzymer som binder og kutter spesifikt til sekvenser inneholdende aminosyrene Pro-X-Gly-Pro, hvor X vanligvis er en nøytral aminosyre. Disse sekvensene finnes hyppig i kollagen og svært sjelden i andre proteiner, hvilket forklarer disse enzymenes høye substratspesifisitet. Idet andre enzymer kan degradere denaturert kollagen, er kollagenaser dessuten de eneste enzymene som spesifikt kan gjenkjenne nativt kollagen og hydrolysere det (Seifter

and Harper, 1970. *Methods Enzymol.* 19, 613–635; Harper, 1980. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1063–1078; Peterkofsky 1982. *Methods Enzymol.* 82, 453–471).

[0005] Behandling av sykdommene forbundet med kollagen skjer i dag ved en kombinasjon av kollagenase G og H i et 1:1-forhold, idet slike enzymer produseres ved gjæring av *Clostridium histolyticum* og renses kromatografisk, (WO2007/089851A3). Noen av disse sykdommene forbundet med unormal akkumulering av kollagen er Dupuytren's sykdom (US005589171A) og oftalmiske sykdommer (US4174389).

[0006] I alle tilfeller presenteres anvendelsen av disse enzymene som en blanding av kollagenaser (Col I og Col II eller Col G og Col H). Dette er fordi prosedyrene for å oppnå disse enzymene inntil i dag har vært ved rensing fra total cellekultur-supernatant eller -miljø fra *Clostridium histolyticum*-gjæring. I det totale kulturmiljøet av slike gjæringer oppnås både ColG og ColH samtidig i et forhold på 1:1. I ytterligere rensetrinn ved kromatografi oppnås en blanding av begge enzymene ColG og ColH for å anvendes som et legemiddel, hvilket er tilfelle for Xiaflex, det første medikamentet basert på kollagenaser som er blitt godkjent av FDA til å behandle Dupuytren's kontraktur.

[0007] Xiaflex presenteres som et lyofilisert pulver, som må rekonstitueres i et løsemiddel rett før anvendelse. Dosen er 0,58 mg ved injeksjon i en palpabel metakarpofalangeal eller intrafalangeal tråd, administrert hver 2. time i 3 litt forskjellige posisjoner innenfor tråden, opp til 3 ganger per tråd ved 4 ukers intervaller.

[0008] Xiaflex inneholder kollagenase AUX-I og kollagenase AUX-II, isolert og renses fra *Clostridium histolyticum*-gjæringsmiljø.

[0009] Kollagenase AUX-I er en enkeltkjede av aminosyrer med observert molekylvekt på 114 kilodalton (kDa). Den tilhører klasse I-kollagenaser fra *Clostridium histolyticum*.

[0010] Kollagenase AUX-II er et enkeltkjedet polypeptid med en observert molekylvekt på 113 kDa. Det tilhører klasse II-kollagenaser fra *Clostridium histolyticum*.

[0011] Disse behandlingene har imidlertid begrensninger avledet fra sluttproduktets art (en vandig løsning av de rekonstituerte kollagenasene AUXI og AUXII), kilden til disse enzymene (*C. hystoliticum*) og kombinasjonen av disse kollagenasene G og H i et forhold på 1:1. Alle disse faktorene gjør det aktuelle medikamentet til et produkt hvis aktivitet er vanskelig å kontrollere, også på grunn av hvordan det frisettes i det berørte området, idet hovedbivirkningene er følgende:

1. Normal seneruptur i behandlingsområdet.
2. Alvorlig skade i leddbåndene i fingrene som skal behandles.
3. Allergiske reaksjoner avledet fra penetreringen av produktet i blodstrømmen.
4. Koaguleringsproblemer avledet fra disrupsjonen av blodkarenes basale membraner.
5. CRPS (*komplekst regionalt smertesyndrom*).
6. Perifert ødem.
7. Smerter og blåmerker.

[0012] Disse bivirkningene er avledet hovedsakelig fra invasjonen i de omkringliggende områdene av injeksjonen av en vandig løsning av kollagenaser. Straks den vandige løsningen er injisert, kan den diffundere fritt til tilstøtende områder og forårsake degradasjon av friske sener, immobilisering av ledd og dessuten ruptur av friske sener og ruptur av nærliggende blodkar, hvilket forårsaker interne blødningshendelser som er smertefulle for pasienten, og invasjon av det farmakologiske produktet i blodstrømmen, hvilket gir alvorlige allergiske reaksjoner.

[0013] Det er derfor nødvendig å finne et medikament, et annet farmasøytisk alternativ som ville gjøre det mulig å oppnå samme resultater uten bivirkningene observert med de aktuelle medikamentene.

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

SAMMENSETNING IFØLGE OPPFINNELSEN

[0014] Forfatterne av den foreliggende oppfinnelsen har utviklet en sammensetning omfattende kollagenase G (ColG eller AUX-I) og kollagenase H (ColH eller AUX-II), idet disse kollagenasene foretrukket er rekombinante enzymer (rColG og rColH), i et presist forhold som viser den beste synergiske aktiviteten. Slike sammensetninger kan dessuten formuleres som en gel for å ha

visse fordeler, slik som reduksjon av den nødvendige dosen (mengden av enzymer), en økt effekt av sammensetningene i behandlingsområdet, reduksjon av de typiske bivirkningene som observeres i andre formuleringer inneholdende kollagenaser, forbedring av medikamentets stabilitet og deretter reduksjon i antallet administreringer som trengs for å oppnå ønsket terapeutisk effekt.

[0015] Et første trekk ved oppfinnelsen vedrører en sammensetning, heretter sammensetning ifølge oppfinnelsen, som omfatter kollagenase G og kollagenase H i et forhold mellom 1:2 og 1:4. Sammensetningen ifølge oppfinnelsen har med andre ord mellom to til fire ganger mer kollagenase H enn kollagenase G, dvs. kollagenasenes masseforhold er mellom 1:2 og 1:4 (G/H)

[0016] Slik fig. 1 viser, viser kollagenaseenzymene en sterk synergisk effekt når de administreres i en sammensetning i slike forhold. Denne synergiske effekten forklares ved hvert av disse enzymenes art. Native kollagenfiber er resistente overfor enzymatisk hydrolyse fordi de har dårlig eksponert areal. Det er derfor at det for en innledende hydrolysefase kreves et enzym med høy affinitet på nativt kollagen, slik som kollagenase G. Denne kollagenasen har to spesifikke regioner for kollagenbinding (figur 2) som gjør det essensielt i en første hydrolysefase.

[0017] Straks kollagenfiberet er delvis hydrolysert, er fiberet mer mottagelig for å bli hydrolysert av andre kollagenolytiske enzymer som er mer aktive, men mindre spesifikke, slik som tilfellet med kollagenase H. Kollagenase H viser den høyeste aktiviteten (figur 1), men mindre affinitet for kollagen fordi den har bare ett kollagenbindingsdomene (figur 2). Det er derfor at den samtidige anvendelsen av ColH viser en synergisk effekt.

[0018] Anvendelsen av andre forhold (ColG/H 1:2–1:4) enn observert i naturen (ColG/H 1:1) har vist seg å ha høyere effekt i hydrolysen av kollagenfiber. I et ytterligere trinn, idet kollagenets spesifikke areal økes, er virkningen av ColH mer effektiv på grunn av dets høyere spesifikke aktivitet (figur 3).

[0019] I en foretrukket utførelsesform finnes kollagenase G og kollagenase H i sammensetningen ifølge oppfinnelsen i et forhold mellom 1:2,5 og 1:3,5. I en mer foretrukket utførelsesform finnes kollagenase G og kollagenase H i sammensetningen ifølge oppfinnelsen i et forhold på 1:3 (figur 3).

[0020] Slik det ble beskrevet i generell forstand produseres kommersielle kollagenolytiske enzymer fra bakterier i slekten *Clostridium*. Den rekombinante produksjonen av slike kollagenolytiske enzymer viser imidlertid en serie fordeler, slik som muligheten til å produsere enzymene kollagenase G og kollagenase H separat, og således sikre tilstrekkelige konsentrasjoner og tillate anvendelse av kollagenase G og H suksessivt i behandlingen av de forskjellige sykdommene og muligheten til å foreta en differensialoppfølging av atferden til begge de proteolytiske enzymene straks de er injisert i organismen, enten gjennom anvendelse i tilfelle interne markører eller på grunn av administrering av hver kollagenase separat.

[0021] I naturen produseres kollagenase G og H i samme mengder, hvilket innebærer en serie vanskeligheter hvis vi ønsker å oppnå et ønsket forhold. Hovedårsaken er at det er vanskelig å separere kollagenase G og H på grunn av den store likheten mellom dem. Rensing utføres ved størrelsesutelukkeskromatografi samt kationisk og anionisk bytte. Enzymene oppnådd på denne måten viser en aktivitet rundt 500 CDU/mg og urenheter målt i kaseinaseaktivitet rundt 50 U/mg.

[0022] I en foretrukket utførelsesform er sammensetningen ifølge oppfinnelsen en farmasøytisk sammensetning. I en annen foretrukket utførelsesform inneholder sammensetningen ifølge oppfinnelsen også en farmasøytisk akseptabel bærer. I enda en annen mer foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen inneholder sammensetningen ifølge oppfinnelsen også en annen aktiv ingrediens.

[0023] Et annet trekk ved oppfinnelsen vedrører anvendelsen av sammensetningen ifølge oppfinnelsen i produksjonen av et medikament, eller alternativt sammensetningen ifølge oppfinnelsen for anvendelse som medikament.

DELEKIT IFØLGE OPPFINNELSEN

[0024] I et annet trekk ved oppfinnelsen beskrives det et delekit (heretter delekit ifølge oppfinnelsen) omfattende minst kollagenase G og kollagenase H i et forhold mellom 1:2 og 1:4. I en foretrukket utførelsesform finnes kollagenase G og kollagenase H i delekitet ifølge oppfinnelsen i et forhold mellom 1:2,5 og 1:3,5. I en foretrukket utførelsesform finnes kollagenase G og kollagenase H i delekitet ifølge oppfinnelsen i et forhold på 1:3. I en annen foretrukket utførelsesform er delesettet ifølge oppfinnelsen et farmasøytisk delekit.

[0025] I en annen foretrukket utførelsesform inneholder delekitet ifølge oppfinnelsen også en farmasøytisk akseptabel bærer. I enda en annen mer foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen inneholder sammensetningen ifølge oppfinnelsen også en annen aktiv ingrediens.

[0026] Delekitet kan omfatte separate formuleringer av kollagenase G og kollagenase H. De separate formuleringene av kollagenase G og kollagenase H kan administreres suksessivt, separat og/eller samtidig (eventuelt med gjentatte mellomrom). De to aktive ingrediensene kan således administreres enten som en del av samme farmasøytiske sammensetning eller i separate farmasøytiske sammensetninger. Kollagenase G kan administreres før, samtidig som eller etter administrering av kollagenase H, eller i en kombinasjon derav. I en foretrukket utførelsesform administreres kollagenase G før kollagenase H.

FARMASØYTISK FORM IFØLGE OPPFINNELSEN

[0027] Et annet trekk ved oppfinnelsen vedrører en farmasøytisk form, heretter farmasøytisk form ifølge oppfinnelsen, omfattende en hvilken som helst av sammensetningene eller delekitet ifølge oppfinnelsen. I en foretrukket utførelsesform er den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen valgt fra listen omfattende: bandasje, salve, krem, pasta, løsning, suspensjon, emulsjon, lotion, liniment, gel, skum, pulver eller hvilken som helst av disse formene kombinert.

[0028] Anvendelsen av hydrogeler koblet med enzymene tillater den kontrollerte frisettingen av den aktive ingrediensen og reduserer dermed de sekundære effektene på grunn av enzymenes virkning i omkringliggende vev på behandlingsområdet. I en annen foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er den farmasøytiske formen følgelig en gel, og er i en enda mer foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen en hydrogel og/eller en gel av hyaluronsyre. Betegnelsen «farmasøytisk form» som anvendt heri vedrører foretrukket blandingen av én eller flere aktive ingredienser med eller uten additiver som viser fysiske karakteristika for adekvat dose, konservering, administrering og biotilgjengelighet.

[0029] Hydrogeler er polymere materialer sammenflettet i et tredimensjonalt nett enten av naturlig opprinnelse eller syntetisk, hvilke øker i størrelse når de settes i kontakt med vann og danner et mykt, elastisk materiale, og som beholder en

vesentlig del av hydrogelen uten å løse den opp. Geler klassifiseres i to typer med hensyn til bindingenes art i et tredimensjonalt nett: fysiske geler og kjemiske geler.

[0030] Kollagenaser er uhyre ustabile proteiner i vandige løsninger, også ved lave temperaturer, og de kan også enkelt denatureres ved kelaterende middel og forskjellige metalliske ioner som kan interagere med kalsiumionet som er vesentlig for den enzymatiske aktiviteten. Disse enzymene er dessuten uhyre sensitive overfor fysikalsk-kjemiske prosedyrer slik som frysing, tining, lyofilisering og tørking, prosesser som vanligvis trengs under fremstillingene av de endelige formuleringene eller farmasøytiske formene.

[0031] Forfatterne av den foreliggende oppfinnelsen har utviklet en ny formulering av enzymene kollagenase G og kollagenase H i en gel av hyaluronsyre, for å oppnå enzymkonsentrasjoner mellom 500 og 3000 CDU/mg i hyaluronsyre, idet slike konsentrasjoner er nødvendige for å sikre effektiv aktivitet på sener, og i hvilke enzymene ikke enkelt denatureres og bedre møter de fysikalsk-kjemiske endringene. Hyaluronsyrens rolle i kontrollen av keratinocyttoprolifisering og i avsetningen av kollagen i sår er også kjent, hvilket reduserer dannelsen av fibrotisk vev og følgelig patologisk sårtilheling (John Chen W.Y. et al., 1997. Wound Repair and Regeneration 7:79–89).

[0032] Et annet trekk ved oppfinnelsen vedrører følgelig en hyaluronsyregel omfattende sammensetningen ifølge oppfinnelsen. I en foretrukket utførelsesform ligger konsentrasjonene av hyaluronsyre i gelen ifølge oppfinnelsen mellom 0,05 % og 4 % (vekt/vekt eller w/w). I en mer foretrukket utførelsesform er konsentrasjonen av hyaluronsyre i gelen ifølge oppfinnelsen 1,5 % w/w.

[0033] I en annen foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er konsentrasjonene av kollagenaser høyere enn 400 CDU/mg, idet de i en mer foretrukket utførelsesform ligger mellom 450 og 5000 CDU/mg hyaluronsyre, og i en enda mer foretrukket utførelsesform ligger mellom 500 og 3000 CDU/mg hyaluronsyre.

[0034] Hyaluronsyrens molekylvekt avhenger blant annet av kilden fra hvilken den oppnås (f.eks. inkludert, men ikke begrenset til: synovialvæske, navlestreng, hud, bakterier via gjæringsprosess eller direkte isolering), og når opp til 5000 kDa (Milas et al., 2001. Biopolymers 59: 191–204).

[0035] I en annen foretrukket utførelsesform ligger hyaluronsyrens molekylvekt mellom 600 og 4000 kDa, og enda mer foretrukket mellom 700 og 3000 kDa. I en foretrukket særlig utførelsesform av oppfinnelsen har

5

[0036] Ekvivalent er også enhver gel som er dannet med lignende konsistens, og som benytter hyaluronsyre med høyere eller lavere molekylvekt og konsentrasjon i vandige løsninger mellom 0,05 % og 4 %. Det kan da anvendes derivater av hyaluronsyre, inkludert blant annet hyaluronsyre saltet med organiske og/eller uorganiske baser (EP0138572 B1), estere av HA med alkoholer i serien alifatisk, aralifatisk, sykloalifatisk, aromatisk, syklistisk eller heterosyklistisk, med en prosentandel av amidering mellom 1 og 10 % og foretrukket 4 % (EP 1095064 B1); derivater av O-sulfater av HA inntil 4. grads sulfatering (EP0702699 B1); interne estere av HA med en prosentandel av intern esterifisering mellom 0,5 og 10 % og foretrukket 5 % (EP 0341745 B1); derivater av deacetylering av fraksjonen av N-acetyl-glukosamin med en prosentandel av deacetylering foretrukket mellom 0,1 og 30 %, mens alle karboksylgrupper av HA kan saltes med organiske eller uorganiske baser (patent EP1313772 B1); perkarboksylerte derivater av HA oppnådd fra oksideringen av den primære hydroksylgruppen av fraksjonen N-acetyl-glukosamin med en grad av perkarboksylering mellom 0,1 og 100 % og foretrukket mellom 25 og 75 %. Alle karboksylgrupper av HA kan saltes med organiske og/eller uorganiske baser (EP1339753).

10

15

20

25

[0037] Hyaluronsyrens densitet må være tilstrekkelig til å tillate lokal behandling og kontinuerlig og kontrollert frisetting av den aktive ingrediensen, kollagenasene. Den optimale densiteten for gelen med hyaluronsyre på 850 kDa og kollagenaser oppnås med konsentrasjoner av hyaluronsyre på 1,5 %, hvilket gjør det mulig å oppnå en tilstrekkelig konsistens for injeksjon i kollagenfiber, holde den aktive ingrediensen lokalt og tillate kontrollert frisetting i administreringsområdet. I en særlig utførelsesform av oppfinnelsen, når hyaluronsyrens molekylvekt er 850 kDa, er konsentrasjonen av denne hyaluronsyren i gelen da 1,5 % w/w.

30

[0038] Karakteristikaene ved hyaluronsyren i gelen vil tillate dens lyofilisering for å bevare den aktive ingrediensen over tid. Straks hyaluronsyren er lyofilisert, må den dessuten rekonstitueres i vann for å oppnå en gel med en lignende konsistens som den i begynnelsen.

35

[0039] For behandling av sykdommene avledet fra den unormale dannelsen av kollagen vil det foretrukket bli anvendt i doser som varierer mellom 2000 og 8000 CDU-er avhengig av sykdommens alvorlighetsgrad. Dosen vil foretrukket være mellom 3000 og 7000 CDU-er, og er mer foretrukket ca. 4000 CDU-er, avhengig av sykdommens alvorlighetsgrad. Mengden i mg som trengs for å formulere en dose på 4000 CDU-er, er direkte forbundet med enhetene i CDU/mg for hver batch, så det ville være nødvendig alltid å henvise til mengden i enheter i stedet for i mg enzym. I og med at enzymenes gjennomsnittlige aktivitet er 3500 CDU/mg i forskjellige batcher, ville nødvendig mengde i mg for hver dose være ca. 1,1 mg per dose av 4000 CDU-er (4000 CDU-er tilsvarer 13 300 ABC-enheter).

[0040] CDU-definisjon: Én kollagenaseenhet er definert som den enzymmengden som hydrolyserer 1 nmol PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg på ett sekund ved pH = 7,1 ved 37 °C (PZ = 4-fenyl-azobensyloksykarbonyl) (Wunsch *et al.*, 1963. *Physiol. Chem.*, 333:149–151).

ANVENDELSER AV SAMMENSETNINGENE, DELEKITET OG DE FARMASØYTISKE FORMENE IFØLGE OPPFINNELSEN

[0041] Forfatterne av den foreliggende oppfinnelsen har vist at sammensetningene, delekitet og de farmasøytiske formene ifølge oppfinnelsen, inkludert hydrogelene av hyaluronsyre (eller dens derivater), omfattende forholdene av kollagenase G og kollagenase H tidligere beskrevet, er nyttige for behandling av sykdommer forbundet med unormale kollagenmisdannelser.

[0042] Et annet trekk vedrører derfor anvendelsen av sammensetningen ifølge oppfinnelsen, eller anvendelsen separat, samtidig eller suksessivt med de aktive ingrediensene (kollagenase G og kollagenase H) i delekitet ifølge oppfinnelsen, eller anvendelsen av den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen, i produksjonen av et medikament. Det vedrører alternativt sammensetningen ifølge oppfinnelsen, delekitet ifølge oppfinnelsen eller den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen, for sin anvendelse i produksjonen av et medikament. I en foretrukket utførelsesform er den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen en hydrogel av hyaluronsyre slik som det er blitt beskrevet tidligere.

[0043] Et annet trekk vedrører anvendelsen av sammensetningen ifølge oppfinnelsen, anvendelsen separat, samtidig eller suksessivt med de aktive ingrediensene (kollagenase G og kollagenase H) i delekitet ifølge oppfinnelsen, eller anvendelsen av den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen, i produksjonen av et medikament for behandling av sykdommer forbundet med forstyrrelser i bindevev, eller alternativt sammensetningen ifølge oppfinnelsen, delekitet ifølge oppfinnelsen eller den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen, for anvendelse i behandlingen av sykdommer forbundet med forstyrrelser i bindevev.

[0044] I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er sykdommen forbundet med forstyrrelser i bindevev fibromatose. I et foretrukket trekk ved oppfinnelsen er fibromatose valgt fra en liste over forstyrrelser som inkluderer: Dupuytren's palmare kontraktur, Peyronies sykdom, Ledderhoses sykdom eller plantar fascial fibromatose, eller forekomst av fibrøst vev i øreflippen, eller fibrose forårsaket av kirurgiske intervensjoner eller uhell kalt retraktile arr.

[0045] Sykdommene forbundet med endringer i kollagenet identifiseres enkelt ved klinisk diagnose og om nødvendig ved histologisk dokumentasjon. Dupuytren's kontraktur diagnostiseres da for eksempel av en lege under fysisk undersøkelse av den berørte hånden.

DEFINISJONER

[0046] Betegnelsene «aktiv ingrediens», «aktivt stoff», «aktivt farmasøytisk stoff», «virkestoff» eller «aktiv farmasøytisk ingrediens» som anvendt heri betyr enhver komponent som potensielt tilveiebringer en farmakologisk aktivitet eller en annen effekt i diagnosen, helbredelsen, dempingen, behandlingen eller forebyggingen av en sykdom, eller som påvirker strukturen og funksjonen i kroppen hos mennesker og hos andre dyr. Betegnelsen inkluderer de komponentene som fremmer en kjemisk endring i utarbeidelsen av medikamentet, og som er til stede i samme i en predikert, modifisert form som tilveiebringer den spesifikke aktiviteten eller effekten.

[0047] Enten sammensetninger ifølge den foreliggende oppfinnelsen eller delekit kan formuleres for administrering til et dyr og mer foretrukket til et pattedyr, inkludert mennesker, i en rekke former som er kjent i teknikken. De kan derfor inkluderes, men ikke begrenses til, steril vandig løsning eller

biologiske fluider, så som serum. De vandige løsninger kan være bufret eller ikke, og de kan inneholde andre aktive eller inaktive ingredienser også. Tilleggskomponentene inkluderer salter for å modulere ionisk styrke, konserveringsmiddel, inkludert, men ikke begrenset til, antimikrobielle middel, antioksidanter, kelaterende middel og lignende, og næringsmiddel inkludert glukose, dekstrose, vitaminer og mineraler. Sammensetningene kan alternativt fremstilles for administrering i fast form. Sammensetninger kan kombineres med andre forskjellige vehikler eller inerte eksipienter, inkludert, men ikke begrenset til: agglutineringsmiddel slik som mikrokrySTALLinsk cellulose, tragakant, gelatin; eksipienter slik som stivelse eller laktose; dispergeringsmiddel slik som alginsyre av maisstivelse; smøremiddel slik som magnesiumstearat; glidemiddel slik som kolloidalt silisiumdioksid; søtningsmiddel slik som sukrose eller sakkarin; eller aromatiske middel slik som mint eller metylsalicylat.

[0048] Betegnelsen «medikament» som anvendt i denne beskrivelsen betyr ethvert stoff som brukes for forebygging, diagnose, lindring, behandling eller helbredelse av sykdommer hos mennesker og dyr. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen er sykdommen en sykdom som er forbundet med endringer i bindevevet, foretrukket er det en fibromatose, og mer foretrukket i en palmar Dupuytren's kontraktur, Peyronies sykdom, Ledderhoses sykdom eller plantar fascial fibromatose, eller retraktable arr.

[0049] Slike sammensetninger eller kombinerte fremstillinger og/eller formuleringer kan administreres til et dyr, inkludert et pattedyr og derfor mennesker, i en rekke former, inkludert, men ikke begrenset til, intraperitoneal, intravenøs, intramuskulær, subkutan, intratekal, intraventrikulær, oral, enteral, parenteral, intranasal eller topisk.

[0050] Dosen for å oppnå en terapeutisk virkningsfull mengde avhenger av en rekke faktorer, så som for eksempel pattedyrets alder, kjønn, vekt og toleranse. Betegnelsen «terapeutisk virkningsfull mengde» som anvendt i denne beskrivelsen betyr den mengden av kollagenase G og kollagenase H som gir den ønskede effekten, og den bestemmes generelt blant annet ved prolegemiddelets, derivatenes eller analogenes iboende karakteristika og ved den terapeutiske effekten som skal oppnås. "Adjuvansen" og de "farmasøytisk akseptable vehiklene" som kan anvendes i slike sammensetninger, er velkjente vehikler på fagfeltet.

[0051] Alle enzymene (kollagenase G og kollagenase H) har en 6 histidintag som gjør det mulig å kombinere dem inn i hydrogelene, slik som hyaluronsyren. 6-histidintagen gjør det også mulig å rense enzymene med nikkelaaffinitetskromatografi. Detekteringen av nærværet av kollagenaser i blodstrømmen eller i tilstøtende vev kan videre skje ved hjelp av immunoassayer (f.eks., men ikke begrenset til, ELISA). For å gjøre det anvendes spesifikke antistoffer mot klostridiale kollagenaser, selv om de ikke skiller mellom kollagenase G og kollagenase H. Kollagenasene i medikamentet har dessuten en 6-histidintag, idet enzymene også kan gjenkjennes både med spesifikke antistoffer mot kollagenasene og mot 6-histidintagen.

[0052] I denne beskrivelsen betyr forstyrrelser i bindevevet sykdommer forbundet med subdermisk akkumulasjon av denne slags vev.

[0053] Betegnelsen fibromatose betyr en gruppe av vev som vanligvis danner godartede tumorer, hvilke er karakterisert ved fravær av cytologisk og klinisk ondartethet. Den kjennes også ved prolifereringen av fibroblaster, en struktur med infiltrativ vekst og en aggressiv klinisk atferd med hyppig rekurrens. Fibromatose inkluderer forskjellige undertyper: juvenil fibromatose, fibromatosis colli, infantil digital fibromatose, infantil myofibromatose, ipofibromatose, fibromatosis hyalinica multiplex, plantar fibromatose, Peyronies sykdom og Dupuytren's sykdom.

[0054] Dupuytren's sykdom (også kalt Dupuytren's kontraktur eller palmar Dupuytren's kontraktur) består av en retraksjon av håndflaten med den situasjon at visse fingre ikke kan bøye seg; det starter vanligvis med en hudforstørrelse i håndflaten som kan utvikle seg til å bli en hard bunt eller et tykt bånd.

[0055] Peyronies sykdom eller induratio penis plastica er en prosess av ukjent årsak karakterisert ved nærvær av et unormalt fibrøst bånd i tunica albuginea i de kavernøse legemene i penis. Det er vanligvis unilateralt og har som hovedkonsekvens en krumning av penis under ereksjon. Avhengig av dette fibrøse båndets utstrekning kan prosessen forhindre eller vanskeliggjøre penetrering, eller volde smerte under ereksjon.

[0056] Ledderhoses sykdom, også kjent som Morbus Ledderhose, plantar fibromatose og plantar aponeurose, er en relativt sjelden tilstand, en godartet fortykning av føttenes dype bindevev, eller fascia. I starten, hvor noder eller

tråder begynner å vokse langs senene i foten, anses sykdommen for mindre alvorlig, men kan være smertefull. Men til slutt tykner tråden, tærne stivner og bøyer seg, og det blir vondt å gå. Som i de fleste tilfeller av fibromatose er den godartet, og dens utvikling varierer fra pasient til pasient. Noduler vokser typisk langsomt og finnes hovedsakelig i de sentrale og mediale delene av det plantare fasciaet. Tidvis kan nodulene være inaktive i måneder eller år, før de plutselig begynner å vokse raskt og uventet. Den eneste løsningen er kirurgi hvis smerten gjør det umulig å gå.

[0057] Kollagenase G i ett av eksemplene ifølge oppfinnelsen har en sekvens på 3357 nukleotider (SEQ ID NO: 3). De 330 første nukleotidene koder for signalpeptidet (SEQ ID NO: 4) den første aminosyren i proteinets modne, sekreterte form kodes av et ATA-kodon. Nærværet av signalpeptidet og dets prosessering sikrer korrekt folding av enzymets endelige aktive naturlige form. For rekombinant kollagenase G tilsettes en sekvens som koder for 6-histidinkodoner før det siste kodonet (stoppkodonet). Denne 6-histidintagen er nødvendig for rensingsformål og for å immobilisere enzymet i de farmasøytiske formene.

[0058] Aminosyresekvensen er sammensatt av 1118 aminosyrer. De 110 aminosyrene i den ytterste N-terminalen utgjør signalpeptidet (SEQ ID NO: 5) og de 1008 øvrige aminosyrene tilsvarer den sekreterte kollagenasen (SEQ ID NO: 1).

[0059] Kollagenase G med signalpeptid anvendt i denne oppfinnelsen har følgende fysikalsk-kjemiske parametere:

- Molekylvekt: 127 kDa.
- Isoelektrisk punkt: 5,8
- Antall negative ladninger (Asp + Glu): 160.
- Antall positive ladninger (Arg + Lys): 142.
- Teoretisk ustabilitetsindeks: 26,61, hvilket klassifiserer proteinet som stabilt.
- Teoretisk halveringstid anslått i *Escherichia coli* (*in vivo*): mer enn 10 timer.

[0060] Kollagenase G uten signalpeptid har følgende fysikalsk-kjemiske parametere:

- Molekylvekt: 114,8 kDa.
- Isoelektrisk punkt: 5,53

- Antall negative ladninger (Asp + Glu): 145.
- Antall positive ladninger (Arg + Lys): 122.
- Teoretisk ustabilitetsindeks: 24,11, hvilket klassifiserer proteinet som stabilt.
- 5 - Teoretisk halveringstid anslått i *Escherichia coli* (*in vivo*): mer enn 10 timer.

[0061] Det kan anvendes andre kollagenaser som ligner kollagenase G i oppfinnelsen. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen defineres
10 «kollagenase G» (ColG eller AUX-I) derfor også av en nukleotid- eller polynukleotidsekvens, som utgjør kodingssekvensen for proteinet «kollagenase G», og som også omfatter forskjellige varianter med utgangspunkt i:

- a) nukleinsyremolekyler som koder for et polypeptid omfattende aminosyresekvensen i SEQ ID NO: 1,
- 15 b) nukleinsyremolekyler hvis komplementære tråd hybridiserer med polynukleotidsekvensen i a),
- c) nukleinsyremolekyler hvis sekvens avviker fra a) og/eller b) på grunn av degenerasjon av den genetiske koden, eller
- d) nukleinsyremolekyler som koder for et polypeptid omfattende en
20 aminosyresekvens med en identitet på minst 80 %, 90 %, 95 %, 98 % eller 99 % med SEQ ID NO: 1 i hvilke polypeptidet kodet av nukleinsyren har aktiviteten og de strukturelle karakteristikaene til proteinet «kollagenase G». Betegnelsen inkluderer også proteiner som skyldes posttranslasjonale modifiseringer.

25

[0062] «Kollagenase H» har en nukleotidsekvens bestående av 3066 nukleotider (SEQ ID NO:6). De 120 første SEQ ID NO: 7) koder for et signalpeptid, og det sekreterte, modne proteinets aminosyre kodes av kodonet (GTA). Signalpeptidet inkorporeres for å tillate sekresjon av enzymet i det
30 ekstracellulære mediet. Signalpeptidet kuttet straks det befinner seg i bakteriemembranen, og det aktive enzymet frisettes i mediet. For rekombinant kollagenase H elimineres det siste kodonet (stoppkodonet) og erstattes av en nukleotidsekvens som koder for 6-histidiner som er nødvendige for den etterfølgende prosessen med rensing eller immobilisering i doseformer.

35

[0063] Aminosyresekvensen består av 1021 aminosyrer. De 40 restene i aminoterminalen omfattende signalpeptidet (SEQ ID NO: 8) og de øvrige 981 for den sekreterte kollagenasen (SEQ ID NO: 2)

5 **[0064]** Kollagenase H med signalpeptid har følgende fysikalsk-kjemiske parametere:

- Molekylvekt: 117,2 kDa
- Isoelektrisk punkt: 5,99
- Antall negative ladninger (Asp + Glu): 142
- 10 – Antall positive ladninger (Arg + Lys): 128
- Teoretisk ustabilitetsindeks: 35,48, hvilket klassifiserer proteinet som stabilt.
- Teoretisk halveringstid anslått i *Escherichia coli* (in vivo): mer enn 10 timer.

15

[0065] Kollagenase H uten signalpeptidet har følgende fysikalsk-kjemiske parametere:

- Molekylvekt: 112,98 Kda
- Isoelektrisk punkt: 5,76
- 20 – Antall negative ladninger (Asp + Glu): 141
- Antall positive ladninger (Arg + Lys): 122
- Teoretisk ustabilitetsindeks: 35,30, hvilket klassifiserer proteinet som stabilt.
- Teoretisk halveringstid anslått i *Escherichia coli* (in vivo): mer enn 10
- 25 timer.

25

[0066] Det kan anvendes andre kollagenaser som ligner kollagenase H i oppfinnelsen. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen defineres «kollagenase H» (ColH eller AUX-II) derfor også av en nukleotid- eller polynukleotidsekvens, som utgjør kodingssekvensen for proteinet «kollagenase H», og som også omfatter forskjellige varianter med utgangspunkt i:

30

- a) nukleinsyremolekyler som koder for et polypeptid omfattende aminosyresekvensen i SEQ ID NO: 2,
- b) nukleinsyremolekyler hvis komplementære tråd hybridiserer med polynukleotidsekvensen i a),
- 35 c) nukleinsyremolekyler hvis sekvens avviker fra a) og/eller b) på grunn av degenerasjon av den genetiske koden, eller

35

d) nukleinsyremolekyler som koder for et polypeptid omfattende en aminosyresekvens med en identitet på minst 80 %, 90 %, 95 %, 98 % eller 99 % med SEQ ID NO: 2. i hvilke polypeptidet kodet av nukleinsyren har aktiviteten og de strukturelle karakteristikaene til proteinet «kollagenase H». Betegnelsen inkluderer også proteiner som skyldes posttranslasjonale modifiseringer.

[0067] Gjennom hele beskrivelsen og alle kravene er betegnelsen «omfatte» og dets varianter ikke ment å utelukke andre tekniske trekk, additiver, komponenter eller trinn. For fagmannen vil andre gjenstander, fordeler og trekk ved oppfinnelsen fremgå av beskrivelsen og utøvelsen av oppfinnelsen. Følgende eksempel og tegninger tilveiebringes for illustrasjonsformål og er ikke ment å begrense den foreliggende oppfinnelsen.

BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0068]

Figur 1. Synergistisk effekt av anvendelsen av kollagenase G og kollagenase H i et forhold på 1:3. Aktivitet av kollagenase G og kollagenase H separat og i kombinasjon i et forhold på 1:3.

Figur 2. Skjema over den molekulære strukturen av kollagenase G og H. Kollagenasene har et felles katalytisk domene og kollagenbindingsdomener (CBD). For ColG gjentas dette domenet slik at affiniteten for kollagen er større.

Figur 3. Sammenligning av den synergistiske virkningen av kollagenaser. Det ble observert en økning i den synergistiske effekten ved anvendelse av kollagenase G/H foretrukket i forholdene 1:2–1:4 og 1:3 med en økning på over 25 % i den spesifikke aktiviteten.

Figur 4. Skjema over injeksjonen av kollagenasedosen i hyaluronsyregelen i en kyllingbenmodell.

Figur 5. Variasjon i lengden på senene etter behandling med kollagenase G/H 1:3 med og uten hyaluronsyre. Slik grafen viser, oppfattes effekten av

AH-kollagenase fra de 24 første timene, og det er en gradvis økning til det oppnås reduksjoner på mer enn 0,5 tommer etter 96 timers behandling.

Figur 6. Variasjon i diameteren på senenes tverrsnitt etter behandling med kollagenase G/H 1:3 med og uten hyaluronsyre.

Differensiell effekt av kollagenase G/H1:3 inkludert i hyaluronsyregeler og i vandig løsning. Slik grafen viser, er det en vesentlig effekt ved å redusere diameteren på senens tverrsnitt etter 24 timers behandling. Effekten av diameterøkning i kontroller etter 24 og 48 timer skyldes volumet på injisert vandig løsning i senen, hvilket i seg selv øker senens diameter.

EKSEMPLER

[0069] I det følgende illustreres oppfinnelsen ved hjelp av forsøk utført av oppfinnerne.

Eksempel 1. Kollagenasenes fremstilling og egenskaper

[0070] Kollagenase H og kollagenase G er metalloproteinaser (klasse II) som spesifikt kan degradere kollagenets helikoidale regioner og gjenkjenne Gly-Pro-X-motivet som er karakteristisk for makromolekylet. Disse proteinene har en hale med 6 histidiner i sin karboksylterminal (Demina & Lysenko. Mikrobiologiia. 1996 May-Jun; 65(3):293-304).

[0071] Isoelektrisk punkt og molekylvekt: Col.H: Pi 5,76; MV 112,98 kDa; Col.G: Pi 5,53; MV 114,8 Kda.

[0072] Renhet: 99,9 % rensing i nikkelaaffinitetskolonner, ionebytte og eksklusjon.

[0073] Den presenteres som lyofilisert og steril. Deionisert sterilt vann brukes for optimal rekonstitusjon:

Fremstilling av stamløsningen

[0074] For fremstilling av kollagenase G/H 1:3 inneholder den lyofiliserte fremstillingen 800 CDU-er (ca. 0,3 mg). For administrering anbefales det å resuspendere innholdet i glasset i 1 ml sterilt mQ-vann for å oppnå en løsning

av enzymet 800 CDU/ml i 20 mM Tris-buffer pH 8,0. Det anbefales å fremstille denne løsningen på anvendelsestidspunktet.

5 **[0075]** Den anbefalte dosen avhenger av sykdommens progresjonsgrad, som varierer mellom 100 og 800 CDU-er per anvendelse.

10 **[0076]** Den rekombinante kollagenase G og H har ingen ikke-spesifikk proteaseaktivitet (kaseinase) Negativ Ladd-Butler-test. De inneholder ikke endotoksiner (negativ genskripttest).

Eksempel 2. Fremstilling av den farmasøytiske formen ifølge oppfinnelsen

15 **[0077]** Rekombinant (rColG og rColH) kollagenase G (ColG eller AUX-I) og kollagenase H (ColH eller AUX-II), separat eller kombinert, og mer spesifikt i forholdet 1:3 formulert som en terapeutisk gel, slik som hyaluronsyre. Hyaluronsyre er klassifisert som medisinsk utstyr og ble produsert av Novozymes Biopharma med en molekylvekt på 850 kDa.

20 **[0078]** Hyaluronsyrens densitet bør være tilstrekkelig til å tillate lokal behandling og kontinuerlig og kontrollert frisetting av den aktive ingrediensen, kollagenaser. Den optimale densiteten av hyaluronsyregelen 850 KDa med kollagenase er 1,5 %, hvilket tillater en egnet konsistens for injeksjon av kollagenfiber, idet den aktive ingrediensen fastholdes lokalt og den kontrollerte frisettingen tillates i anvendelsesområdet.

25

[0079] Enhver annen gel med lignende konsistens fremstilt med hyaluronsyre er ekvivalent, med høyere eller lavere molekylvekt og konsentrasjon av samme i vandige løsninger som varierer mellom 0,05 % og 4 %.

30 **[0080]** Hyaluronsyrens karakteristika må tillate lyofilisering for å bevare den aktive ingrediensen over tid. Straks hyaluronsyren er lyofilisert, må den dessuten rekonstitueres i vann for å oppnå en lignende gelkonsistens som den i begynnelsen. Tabell 1 viser gelens evne til å gjenoppbygge sin konsistens etter lyofilisering.

35

Materialer

[0081]

Hyaluronsyreref. NZ HA - MMW 0,85 MDa medisinsk utstyr

Hyaluronsyreref. NZ HA - HMW 1,3 MDa medisinsk utstyr

PBS-buffer 4 mM GIBCO™

5

Analytisk metode (utstyr)**[0082]**

Brookfield-viskometer (LVDV II + Pro)

10

Temperatur 25 °C

Geometri. Kon/plate CP 40

Analyse av molekylvekt (SEC-MALS-RI)

System: Waters Alliance HPLC-system og Wyatt MALS (Dawn EOS) og RI (Optilab rEX)

15

Programvare: ASTRA 5.

Kolonner: TSKgel PWXL-skjermkolonne (4 cm x 6,0 mm ID) og 2 x TSKgel G5000PWXL (30 cm x 7,8 mm ID).

Standarder: Ref HA, Dextran og BSA

20

[0083] Anvendelsesforholdet mellom kollagenase G og kollagenase H fastslås ved å bestemme den spesifikke aktiviteten mellom de to og i synergi slik figur 3 viser. Aktiviteten av blandinger av lyofilisert ColG og ColH utføres ved alltid å fastholde samme forhold av ColG og variere forholdet av ColH, som er proteinet som øker den totale kollagenaseaktiviteten. I alle de tre viste studiene observeres det at to av tre ganger består den optimale blandingen av 1 molekyl av ColG og 3 molekyler av ColH. Den optimale blandingen av ColG/H øker sluttaktiviteten mer enn 33 ganger aktiviteten av ColG eller 3 ganger aktiviteten av ColH separat og mer enn 25 % 1:1-blanding av ColG:ColH (figur 3).

25

30

[0084] Resultatene av rekonstitusjonen av haluronsyren med destillert vann etter lyofilisering av den opprinnelige gelen indikerer at hyaluronsyreprøver med 3000 CDU-er kollagenase G/H i 1:3-forhold ved konsentrasjoner på 1,0, 1,5 og 2,0 % hyaluronsyre 850 KDa og 1 % hyaluronsyre 1300 KDa i PBS-buffer har forskjellig atferd, slik følgende tabell (tabell 1) viser:

35

Tabell 1. Viskositet og molekylvekt for hyaluronsyreformuleringer på 850 kDa og 1300 kDa; cP (centipoise): viskositetsmåling; MW (kDa): Molekylvektmåling ekstrahert fra viskositetsverdien.

Prøve	Viskositet (cP)	Molekylvekt (KDa)
850 – 1,0 %	218	707
850 – 1,5 %	3203	
850 – 2,0 %	5034	
1300 – 1,0 %	1150	1,339

5

[0085] Etter lyofilisering ble prøvene gjenoppløst ved 25 °C i deionisert vann, og både molekylvekt og dynamisk viskositet (DV) ble målt. Resultatene vises i følgende tabell (tabell 2):

Prøve	Viskositet	% fastholdt viskositet	Molekylvekt (KDa)	% fastholdt molekylvekt	rekonstitusjonstid
850 – 1,0 %	249	114,2	763	108	< 10 min
850 – 1,5 %	2920	91,2	780	110	< 15 min
850 – 2,0 %	4542	90,2	757	107	< 20 min
1300 – 1,0 %	1076	93,6	1275	95	< 90 min

10

[0086] Som anført i tabell 2 er både molekylvekt og bevart viskositet fullstendig gjenvunnet etter lyofilisering og gjenoppløsning.

[0087] Rekonstitusjon av utvalgte prøver på 850 kDa må skje etter lyofilisering, med omrøring i 10–20 minutter, og dem på 1300 kDa med omrøring i mer enn 90 minutter.

5 **[0088]** Ovenstående prøver ble analysert av ortopedisk avdeling ved Universitetssykehuset i Albacete, som vurderte gelenes konsistens, håndteringen av de hypodermiske nålene (referanse: hypodermisk nål 13 mm lengde og 0,3 mm diameter), manipuleringen og sene retensjonen. Resultatene vises i følgende tabell (tabell 3):

10

Tabell 3. Vurdering av hydrogelene. Rangering: Dårlig: 0–1, Middels: 2–3, God: 4–5

Prøve	Konsistens	Nålhåndtering	Manipulering	Seneretensjon	TOTALVERDI
850 – 1,0 %	2	5	5	2	14
850 – 1,5 %	5	4	5	5	19
850 – 2,0 %	5	3	3	5	16
1300 – 1,0 %	5	2	3	5	15

15 **[0089]** Ifølge tidligere resultater ble den ideelle konsentrasjonen på 1,5 % valg, idet den hadde den høyeste poengsummen blant de analyserte prøvene. Anvendelsen av andre kildematerialer og forskjellige konsentrasjoner utelukkes imidlertid ikke, avhengig av behovene observert av legen.

20 **[0090]** Renhetsnivåene må oppfylle GMP (*Good Manufacturing Practices*)-forskriften for anvendelse av biologiske produkter til human anvendelse.

Presentasjon av sluttproduktet

25 **[0091]** Legemiddelet presenteres i en pulverform som må rekonstitueres i 0,450 ml i sterile borsilikatglass. Hvert glass inneholder mellom 2000 og 8000

CDU-er kollagenase, foretrukket 4000 CDU (ca. 1,1 mg) inneholdende ColH-proteiner og lyofilisert hyaluronsyre og en buffer inneholdende 2 mM CaCl₂ og 150 mM NaCl. Legemiddelet rekonstitueres med sterilt deionisert vann som leveres i et annet separat glass. Prosessen med rekonstitusjon av en

5 hyaluronsyregel 1,5 % 850 KDa involverer inkuberingen av den lyofiliserte gelen i sterilt deionisert vann i 15 minutter under omrøring ved 25 °C.

[0092] Sluttproduktet er en gel inneholdende den nødvendige og tilstrekkelige aktive ingrediensen for å behandle anomaliene sett ved noen sykdommer slik

10 som Dupuytren's kontraktur og andre lignende anomalier.

[0093] For behandling av sykdommer forbundet med unormal kollagenmisdannelse anvendes foretrukket 4000 CDU-er, selv om dosene kan variere mellom 2000 og 8000 CDU-er, avhengig av sykdommens alvorlighetsgrad.

15 De nødvendige milligrammene for å formulere dosen på 4000 CDU-er er direkte forbundet med CDU-enhetene/mg i hver batch, derfor er det nødvendig alltid å referere dosene til enzymenheter. I og med at enzymenes gjennomsnittlige aktivitet er 3500 CDU/mg per batch, ville de nødvendige milligrammene for hver dose være ca. 1,1 mg for 4000 CDU-doser (4000 CDU tilsvarer ca. 13 300 ABC-enheter).

[0094] Effektstudier utført med kollagenase G/H i et forhold på 1:3 i nærvær av hyaluronsyre 850 KDa ved 1,5 % i kyllingsener viser gelens effekt med hensyn til den vandige løsningen.

25 **Eksempel 3. Ex vivo- og in vitro-studier av gelaktiviteten på kyllingsener**

[0095] Gelens aktivitet ble analysert på kyllingseneprøver. *Ex vivo*-tester ble utført og tester av effekten av kollagenase over tid.

30 **[0096]** *Ex vivo*-testene på dosene som skal anvendes, er utført på 40 kyllingsener på hvilke over 80 resultater ble analysert. Med hensyn til testene av effekten av kollagenase på senene over tid analyserte vi 24 sener med til sammen 7 mål for hver sene, hvilket derfor innebærer at vi analyserte 168 resultater.

35 **[0097]** Kyllingbena ble injisert i senen i tre forskjellige deler på steder vist på figur 4; de anvendte dosene var 3000 CDU-er i et totalt volum på

450 mikroliter Hyaluronsyregel (en dose deles i disse tre injeksjonsstedene). Anvendelsene ble foretatt på baksiden av bena hvor hovedsenene er lokalisert.

[0098] For å bestemme produktet effekt er det blitt utført forskjellige typer av *in vitro*-testing, slik som:

- Dosebestemmelse
- Histologiske studier
- Immunhistokjemiske studier

Dosebestemmelse:

[0099] Den optimale kollagenasegelanvendelsesdosen på senen ble bestemt ved å anvende forskjellige doser på kyllingbenet.

[0100] En økende gradient av doser av kollagenase G/H i et forhold på 1:3 ble anvendt (tabell 4):

Tabell 4. Økende doser av kollagenase G/H i et forhold på 1:3

Kollagenaseaktivitet (CDU)	Anvendelse av disse enhetene på:
300	- Kollagenase + hyaluronsyre - Kollagenase + buffer - Kontrollbuffer
1500	
3000	
6000	
12000	

[0101] I hvert ben ble det utført et langsgående snitt for å eksponere senen og foreta alle tre injeksjoner på vevet. Benet ble deretter sydd for å lette kollagenasegelens virkning på vevet.

[0102] Dosene av kollagenase G/H 1:3 ble resuspendert i 50 µl sterilt vann.

[0103] Den tilsvarende mengden av hyaluronsyre ble parallelt resuspendert i 400 µl sterilt vann for å oppnå en konsentrasjon på 1,5 %. Begge løsningene ble blandet, hvilket ga en total løsning på 450 µl. Den 50 µl dosen av det tilsvarende enzymet ble på den annen side blandet med vann, hvilket således oppnådde den andre bufferen under studie.

[0104] Det vil være to negative kontroller, én hvor en løsning på 1,5 % hyaluronsyre (450 µl) vil bli injisert, og en negativ kontroll hvor 450 µl sterilt vann vil bli injisert.

[0105] Prøver med forskjellige doser ble holdt urørlige og nedsenket i sterilt PBS 1x pH 7,2 ved 37 °C i 72 timer, hvorefter effekten ble undersøkt.

[0106] Etter denne perioden ble bena dissekert, idet ekstraherte sener ble vasket i PBS 1x pH 7,2. Vevet ble evaluert i immunhistokjemiske studier som bestemte at den optimale dosen var 3000 CDU-er, slik følgende tabell (tabell 5) viser:

Tabell 5 Histokjemisk rangering av de anvendte dosene. Ingen åpenbar effekt: 0; Lett effekt: 1; Vesentlig effekt: 2; Uproporsjonal effekt: 3.

CDU-er	Effekt på senen	Effekt over tilstøtende vev
300	0	0
1500	1	0
3000	2	0
6000	2	2
12000	3	3

[0107] Etter analysen av de immunhistokjemiske resultatene på senen og de omkringliggende vevene ble 3000 CDU-er bestemt å være den optimale dosen, hvilket gir en vesentlig effekt på senen og ingen effekt på tilstøtende vev.

Eksempel 4. Bestemmelse av den sammenlignede effekten mellom kollagenase i vandig løsning og i hyaluronsyregel

[0108] 3000 CDU-er kollagenase ble anvendt som den optimale anvendelsen på senens kollagenasegeldose. Studien ble utført på nylig ekstraherte sener hentet fra kyllingben ved kirurgi. Alle senene ble målt i begynnelsen av forsøket for å ta kontrollreferansen, for under disseksjon av senene får ikke nærværet av kollagenase dem til å brette, men hydrolyseeffekten observeres i størrelsesreduksjonen.

[0109] Straks senene var målt, ble de injisert med hypodermiske sprøyter med lignende mengder av 450 µl PBS-buffer, kollagenase G/H 1:3 i 1,5 % 850 kDa hyaluronsyregel og kollagenase G/H 1:3 i PBS-buffer.

[0110] Testene ble utført etter 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 180 h og 7 dager. Etter hver av disse periodene ble senenes størrelsesvariasjon målt, hvilket således oppnådde en vesentlig reduksjon for AH-kollagenase med hensyn til kontrollen og kollagenasen i løsning, slik følgende tabell (tabell 6) viser:

Tabell 6. Reduksjon i senestørrelse (i centimeter (cm)). Forskjellene med hensyn til kontrollen og kollagenasen i vandig løsning er vesentlig, hovedsakelig på grunn av fortynningseffekten etter injeksjonen. Denne fortynningseffekten observeres ikke for gelen, idet den er et produkt med en fast struktur og hvis virkning er lokalt konsentrert på senen.

	Kontroll-PBS	Kollagenase-PBS	AH-kollagenase
T = 0 h	0	0	0
T = 24 h	0,0375	0,0875	-0,0625
T = 48 h	0,0375	-0,1125	-0,1625
T = 72 h	0,0375	-0,0125	-0,3625
T = 96 h	0,0375	-0,0625	-0,5125
T = 120 h	0,0875	-0,0125	-0,4125
T = 7 dager	0,0458	-0,05	-0,5125

[0111] Effekten observert i fortykningen av senen etter samme tidligere behandling viser dessuten en reduksjon i senens tverrsnittsdiameter som er vesentlig for kollagenasene inkludert i hyaluronsyregelen, slik nedenstående tabell (tabell 7) viser:

5

Tabell 7. Variasjon i centimeter i diameteren på senenes tverrsnitt etter behandling med kollagenase.

	AH-kollagenase	Kontroll	Kollagenase-buffer
T = 0 h	0	0	0
T = 24 h	-0,025	0,125	0,175
T = 48 h	-0,025	0,025	0,125
T = 72 h	-0,125	-0,025	-0,025
T = 96 h	-0,075	0,075	-0,025
T = 120 h	-0,125	-0,025	-0,025
T = 7 dager	-0,125	0,025	0,0125

SEKVENSLISTE

<110> Zurko Research

5 <120> uso de colagenasa G recombinante, colagenasa H recombinante y pz-peptidasa recombinante para el tratamiento de enfermedades que cursan con alteraciones del colágeno.

<130> Zurko 2281

10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 1008

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Colagenasa G

<400> 1

28

Ile Ala Asn Thr Asn Ser Glu Lys Tyr Asp Phe Glu Tyr Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Leu Ser Tyr Thr Glu Leu Thr Asn Leu Ile Lys Asn Ile Lys Trp Asn
 20 25 30
 Gln Ile Asn Gly Leu Phe Asn Tyr Ser Thr Gly Ser Gln Lys Phe Phe
 35 40 45
 Gly Asp Lys Asn Arg Val Gln Ala Ile Ile Asn Ala Leu Gln Glu Ser
 50 55 60
 Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asn Asp Met Lys Gly Ile Glu Thr Phe Thr
 65 70 75 80
 Glu Val Leu Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Tyr Asn Asp Gly Leu
 85 90 95
 Ser Tyr Leu Asn Asp Arg Asn Phe Gln Asp Lys Cys Ile Pro Ala Met
 100 105 110
 Ile Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Ala Val Gln
 115 120 125
 Asp Glu Val Ile Thr Ser Leu Gly Lys Leu Ile Gly Asn Ala Ser Ala
 130 135 140
 Asn Ala Glu Val Val Asn Asn Cys Val Pro Val Leu Lys Gln Phe Arg
 145 150 155 160
 Glu Asn Leu Asn Gln Tyr Ala Pro Asp Tyr Val Lys Gly Thr Ala Val
 165 170 175

Asn Glu Leu Ile Lys Gly Ile Glu Phe Asp Phe Ser Gly Ala Ala Tyr
 180 185 190
 Glu Lys Asp Val Lys Thr Met Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Pro Phe
 195 200 205
 Ile Asn Glu Leu Lys Ala Leu Gly Leu Tyr Gly Asn Ile Thr Ser Ala
 210 215 220
 Thr Glu Trp Ala Ser Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Leu Ser Lys Phe Gly
 225 230 235 240
 Leu Tyr Ser Thr Asn Arg Asn Asp Ile Val Gln Ser Leu Glu Lys Ala
 245 250 255
 Val Asp Met Tyr Lys Tyr Gly Lys Ile Ala Phe Val Ala Met Glu Arg
 260 265 270
 Ile Thr Trp Asp Tyr Asp Gly Ile Gly Ser Asn Gly Lys Lys Val Asp
 275 280 285
 His Asp Lys Phe Leu Asp Asp Ala Glu Lys His Tyr Leu Pro Lys Thr
 290 295 300
 Tyr Thr Phe Asp Asn Gly Thr Phe Ile Ile Arg Ala Gly Asp Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Glu Glu Lys Ile Lys Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Arg Glu Val Lys
 325 330 335
 Ser Gln Phe His Arg Val Val Gly Asn Asp Lys Ala Leu Glu Val Gly
 340 345 350
 Asn Ala Asp Asp Val Leu Thr Met Lys Ile Phe Asn Ser Pro Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Lys Phe Asn Thr Asn Ile Asn Gly Val Ser Thr Asp Asn Gly Gly
 370 375 380
 Leu Tyr Ile Glu Pro Arg Gly Thr Phe Tyr Thr Tyr Glu Arg Thr Pro
 385 390 395 400
 Gln Gln Ser Ile Phe Ser Leu Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Tyr Thr
 405 410 415
 His Tyr Leu Gln Ala Arg Tyr Leu Val Asp Gly Leu Trp Gly Gln Gly
 420 425 430
 Pro Phe Tyr Glu Lys Asn Arg Leu Thr Trp Phe Asp Glu Gly Thr Ala
 435 440 445

Glu Phe Phe Ala Gly Ser Thr Arg Thr Ser Gly Val Leu Pro Arg Lys
 450 455 460
 Ser Ile Leu Gly Tyr Leu Ala Lys Asp Lys Val Asp His Arg Tyr Ser
 465 470 475 480
 Leu Lys Lys Thr Leu Asn Ser Gly Tyr Asp Asp Ser Asp Trp Met Phe
 485 490 495
 Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Val Ala His Tyr Leu Tyr Glu Lys Asp Met
 500 505 510
 Pro Thr Phe Ile Lys Met Asn Lys Ala Ile Leu Asn Thr Asp Val Lys
 515 520 525
 Ser Tyr Asp Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ser Asp Asp Ala Asn Lys Asn
 530 535 540
 Thr Glu Tyr Gln Asn His Ile Gln Glu Leu Ala Asp Lys Tyr Gln Gly
 545 550 555 560
 Ala Gly Ile Pro Leu Val Ser Asp Asp Tyr Leu Lys Asp His Gly Tyr
 565 570 575
 Lys Lys Ala Ser Glu Val Tyr Ser Glu Ile Ser Lys Ala Ala Ser Leu
 580 585 590
 Thr Asn Thr Ser Val Thr Ala Glu Lys Ser Gln Tyr Phe Asn Thr Phe
 595 600 605
 Thr Leu Arg Gly Thr Tyr Thr Gly Glu Thr Ser Lys Gly Glu Phe Lys
 610 615 620
 Asp Trp Asp Glu Met Ser Lys Lys Leu Asp Gly Thr Leu Glu Ser Leu
 625 630 635 640
 Ala Lys Asn Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe Thr
 645 650 655
 Asn Tyr Arg Val Thr Ser Asp Asn Lys Val Gln Tyr Asp Val Val Phe
 660 665 670
 His Gly Val Leu Thr Asp Asn Ala Asp Ile Ser Asn Asn Lys Ala Pro
 675 680 685
 Ile Ala Lys Val Thr Gly Pro Ser Thr Gly Ala Val Gly Arg Asn Ile
 690 695 700
 Glu Phe Ser Gly Lys Asp Ser Lys Asp Glu Asp Gly Lys Ile Val Ser
 705 710 715 720

31

Tyr Asp Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ala Thr Ser Arg Gly Lys Asn Ser
 725 730
 Val His Ala Tyr Lys Lys Ala Gly Thr Tyr Asn Val Thr Leu Lys Val
 740 745 750
 Thr Asp Asp Lys Gly Ala Thr Ala Thr Glu Ser Phe Thr Ile Glu Ile
 755 760 765
 Lys Asn Glu Asp Thr Thr Thr Pro Ile Thr Lys Glu Met Glu Pro Asn
 770 775 780
 Asp Asp Ile Lys Glu Ala Asn Gly Pro Ile Val Glu Gly Val Thr Val
 785 790 795 800
 Lys Gly Asp Leu Asn Gly Ser Asp Asp Ala Asp Thr Phe Tyr Phe Asp
 805 810 815
 Val Lys Glu Asp Gly Asp Val Thr Ile Glu Leu Pro Tyr Ser Gly Ser
 820 825 830
 Ser Asn Phe Thr Trp Leu Val Tyr Lys Glu Gly Asp Asp Gln Asn His
 835 840 845
 Ile Ala Ser Gly Ile Asp Lys Asn Asn Ser Lys Val Gly Thr Phe Lys
 850 855 860
 Ser Thr Lys Gly Arg His Tyr Val Phe Ile Tyr Lys His Asp Ser Ala
 865 870 875 880
 Ser Asn Ile Ser Tyr Ser Leu Asn Ile Lys Gly Leu Gly Asn Glu Lys
 885 890 895
 Leu Lys Glu Lys Glu Asn Asn Asp Ser Ser Asp Lys Ala Thr Val Ile
 900 905 910
 Pro Asn Phe Asn Thr Thr Met Gln Gly Ser Leu Leu Gly Asp Asp Ser
 915 920 925
 Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Glu Val Lys Glu Glu Gly Glu Val Asn Ile
 930 935 940
 Glu Leu Asp Lys Lys Asp Glu Phe Gly Val Thr Trp Thr Leu His Pro
 945 950 955 960
 Glu Ser Asn Ile Asn Asp Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Val Asp Gly Asn
 965 970 975
 Lys Val Ser Asn Lys Val Lys Leu Arg Pro Gly Lys Tyr Tyr Leu Leu
 980 985 990
 Val Tyr Lys Tyr Ser Gly Ser Gly Asn Tyr Glu Leu Arg Val Asn Lys
 995 1000 1005

<210> 2

<211> 981

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Colagenasa H

<400> 2

5

```

val Gln Asn Glu Ser Lys Arg Tyr Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu
1      5      10      15
Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu Leu Val Lys Thr Glu Ile Glu Asn
20     25     30
Leu Pro Asp Leu Phe Gln Tyr Ser Ser Asp Ala Lys Glu Phe Tyr Gly
35     40     45
Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile Met Asp Glu Ile Gly Arg Arg Ala
50     55     60
Pro Gln Tyr Thr Glu Ile Asp His Lys Gly Ile Pro Thr Leu Val Glu
65     70     75     80
val Val Arg Ala Gly Phe Tyr Leu Gly Phe His Asn Lys Glu Leu Asn
85     90     95
Glu Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys Glu Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu
100    105   110
Ala Ile Gln Lys Asn Pro Asn Phe Lys Leu Gly Thr Glu Val Gln Asp
115    120   125
Lys Ile Val Ser Ala Thr Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu Thr Ala Pro
130    135   140
Pro Glu Val Val Asn Asn Phe Thr Pro Ile Leu Gln Asp Cys Ile Lys
145    150   155   160
Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe
165    170   175
Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr Asp Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Ala
180    185   190
Thr Lys Glu Lys Pro Glu Asn Thr Pro Trp Tyr Gly Lys Ile Asp Gly
195    200   205
Phe Ile Asn Glu Leu Lys Lys Leu Ala Leu Tyr Gly Lys Ile Asn Asp
210    215   220

```

33

Asn 225 Asn Ser Trp Ile Ile 230 Asp Asn Gly Ile Tyr 235 His Ile Ala Pro Leu 240
 Gly Lys Leu His Ser 245 Asn Asn Lys Ile Gly 250 Ile Glu Thr Leu Thr 255 Glu
 Val Met Lys Val 260 Tyr Pro Tyr Leu Ser 265 Met Gln His Leu Gln 270 Ser Ala
 Asp Gln Ile 275 Lys Arg His Tyr Asp 280 Ser Lys Asp Ala Glu 285 Gly Asn Lys
 Ile Pro 290 Leu Asp Lys Phe Lys 295 Lys Glu Gly Lys Glu 300 Lys Tyr Cys Pro
 Lys Thr Tyr Thr Phe 310 Asp Asp Gly Lys Val Ile 315 Ile Lys Ala Gly Ala 320
 Arg Val Glu Glu Glu 325 Lys Val Lys Arg Leu 330 Tyr Trp Ala Ser Lys 335 Glu
 Val Asn Ser Gln 340 Phe Phe Arg Val Tyr 345 Gly Ile Asp Lys Pro 350 Leu Glu
 Glu Gly Asn 355 Pro Asp Asp Ile Leu 360 Thr Met Val Ile Tyr 365 Asn Ser Pro
 Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Ser 375 Val Leu Tyr Gly Tyr 380 Asp Thr Asn Asn
 Gly 385 Gly Met Tyr Ile Glu 390 Pro Glu Gly Thr Phe 395 Phe Thr Tyr Glu Arg 400
 Glu Ala Gln Glu Ser 405 Thr Tyr Thr Leu Glu 410 Glu Leu Phe Arg His 415 Glu
 Tyr Thr His Tyr 420 Leu Gln Gly Arg Tyr 425 Ala Val Pro Gly Gln 430 Trp Gly
 Arg Thr Lys 435 Leu Tyr Asp Asn Asp 440 Arg Leu Thr Trp Tyr 445 Glu Glu Gly
 Gly Ala Glu Leu Phe Ala Gly 455 Ser Thr Arg Thr Ser 460 Gly Ile Leu Pro
 Arg Lys Ser Ile Val Ser 470 Asn Ile His Asn Thr 475 Thr Arg Asn Asn Arg 480
 Tyr Lys Leu Ser Asp 485 Thr Val His Ser Lys 490 Tyr Gly Ala Ser Phe 495 Glu

Phe Tyr Asn Tyr Ala Cys Met Phe Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp
 500 505 510
 Met Gly Ile Leu Asn Lys Leu Asn Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val
 515 520 525
 Asp Gly Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu
 530 535 540
 Asn Asp Lys Tyr Gln Asp His Met Gln Glu Arg Ile Asp Asn Tyr Glu
 545 550 555 560
 Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala
 565 570 575
 Tyr Lys Asn Pro Asn Glu Ile Tyr Ser Glu Ile Ser Glu Val Ala Lys
 580 585 590
 Leu Lys Asp Ala Lys Ser Glu Val Lys Lys Ser Gln Tyr Phe Ser Thr
 595 600 605
 Phe Thr Leu Arg Gly Ser Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Lys Gly Lys Leu
 610 615 620
 Glu Asp Gln Lys Ala Met Asn Lys Phe Ile Asp Asp Ser Leu Lys Lys
 625 630 635 640
 Leu Asp Thr Tyr Ser Trp Ser Gly Tyr Lys Thr Leu Thr Ala Tyr Phe
 645 650 655
 Thr Asn Tyr Lys Val Asp Ser Ser Asn Arg Val Thr Tyr Asp Val Val
 660 665 670
 Phe His Gly Tyr Leu Pro Asn Glu Gly Asp Ser Lys Asn Ser Leu Pro
 675 680 685
 Tyr Gly Lys Ile Asn Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Glu Lys Glu Lys Ile
 690 695 700
 Lys Phe Ser Ser Glu Gly Ser Phe Asp Pro Asp Gly Lys Ile Val Ser
 705 710 715 720
 Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Asn Lys Ser Asn Glu Glu Asn Pro
 725 730 735
 Glu His Ser Tyr Asp Lys Val Gly Thr Tyr Thr Val Lys Leu Lys Val
 740 745 750
 Thr Asp Asp Lys Gly Glu Ser Ser Val Ser Thr Thr Thr Ala Glu Ile
 755 760 765

35

Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu Pro Val Ile Tyr Met His Val Pro
 770 775 780
 Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gln Lys Val Val Phe Tyr Gly Lys Gly Thr
 785 790 795 800
 Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala Gly Tyr Gln Trp Asp Phe Gly Asp
 805 810 815
 Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gln Asn Pro Ser His Val Tyr Thr Lys
 820 825 830
 Lys Gly Glu Tyr Thr Val Thr Leu Arg Val Met Asp Ser Ser Gly Gln
 835 840 845
 Met Ser Glu Lys Thr Met Lys Ile Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro
 850 855 860
 Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly
 865 870 875 880
 Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser
 885 890 895
 Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys
 900 905 910
 Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr
 915 920 925
 Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn
 930 935 940
 Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His
 945 950 955 960
 Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu
 965 970 975
 Gly Ser Val Gly Arg
 980

<210> 3

<211> 3357

5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> collagenasa G y péptido señal

10

<400> 3

atgaaaaaaaa atatttttaa gattcttatg gatagttatt ctaaagaatc taaaattcaa

60

actgtacgta gggttacgag tgtatcactt ttagcggat atcttactat gaatacttca	120
agtttagttt tagcaaaacc aatagaaaat actaatgata ctagtataaa aaatgtggag	180
aaattaagaa atgctccaaa tgaagagaat agtaaaaagg tagaagatag taaaaatgat	240
aaggtagaac atgtgaaaaa tatagaagag gcaaagggtt agcaagttgc acccgaagta	300
aaatctaaat caactttaag aagtgcttct atagcgaata ctaattctga gaaatatgat	360
tttgagtatt taaatgggtt gagctatact gaacttaca atttaattaa aaatataaag	420
tggaatcaaa ttaatgggtt atttaattat agtacagggt ctcaaaagt ctttgagat	480
aaaaatcgtg ta'caagctat aattaatgct ttacaagaaa gtggaagaac ttacactgca	540
aatgatatga agggatagaa aactttcact gaggttttaa gagctgggtt ttatttaggg	600
tactataatg atggtttatc ttatttaaat gatagaaact tccaagataa atgtatacct	660
gcaatgattg caattcaaaa aaatcctaac tttaagctag gaactgcagt tcaagatgaa	720
gttataactt ctttaggaaa actaatagga aatgcttctg ctaatgctga agtagttaat	780
aattgtgtac cagttctaaa acaatttaga gaaaacttaa atcaatatgc tcctgattac	840
gttaaaggaa cagctgtaaa tgaattaatt aaagggtatt aattcgattt ttctgggtgct	900
gcatatgaaa aagatgttaa gacaatgcct tggatgggaa aaattgatcc atttataaat	960
gaacttaagg ccttaggtct atatggaaat ataacaagtg caactgagtg ggcactctgat	1020
gttggaatat actatttaag taaattcggc ctttactcaa ctaaccgaaa tgacatagta	1080
cagtcacttg aaaaggctgt agatatgtat aagtatggta aaatagcctt ttagcaatg	1140
gagagaataa cttgggatta tgatgggatt ggttctaatt gtaaaaagggt ggatcacgat	1200
aagttcttag atgatgctga aaaacattat ctgccaaaga catatacttt tgataatgga	1260
acctttatta taagagcagg ggataaggta tccgaagaaa aaataaaaag gctatatagg	1320
gcatcaagag aagtgaagtc tcaattccat agagtagttg gcaatgataa agctttagag	1380
gtgggaaatg ccgatgatgt tttaactatg aaaatattta atagcccaga agaataataa	1440
tttaatacca atataaatgg tgaagcact gataatgggt gtctatatat agaaccaaga	1500
gggactttct acacttatga gagaacacct caacaaagta ttttagtct tgaagaattg	1560
tttagacatg aatatactca ctatttaca gcgagatatt ttgtagatgg tttatggggg	1620
caaggtccat ttatgaaaa aaatagatta acttggtttg atgaaggtag agctgaattc	1680
tttgaggat ctaccctgac atctgggtgt ttaccaagaa aatcaatatt aggatatttg	1740
gctaaggata aagtagatca tagatactca ttaagaaga ctcttaattc agggtagat	1800
gacagtgatt ggatgttcta taattatgga ttgacagttg cacattacct atatgaaaaa	1860
gatatgccta catttattaa gatgaataaa gctatatgta atacagatgt gaaatcttat	1920
gatgaaataa taaaaaaatt aagtgatgat gcaataaaa atacagaata tcaaaaccat	1980
attcaagagt tagcagataa atatcaagga gcaggcatat ctctagtatc agatgattac	2040
ttaaaagatc atggatataa gaaagcatct gaagtatatt ctgaaatttc aaaagctgct	2100

37

```

tctcttaca acactagtgt aacagcagaa aaatctcaat attttaacac attcacttta 2160
agaggaactt atacaggtga aacttctaaa ggtgaattta aagattggga tgaaatgagt 2220
aaaaaattag atggaacttt ggagtccttt gctaaaaatt ctggagtggt atacaaaact 2280
ttaacagcat actttacgaa ttatagagtt acaagcgata ataaagttca atatgatgta 2340
gttttccatg gggttttaac agataatgcg gatattagta acaataaggc tccaatagca 2400
aaggtaactg gaccaagcac tgggtgctgta ggaagaaata ttgaatttag tggaaaagat 2460
agtaaagatg aagatggtaa aatagtatca tatgattggg attttgcgga tggtgcaact 2520
agtagaggca aaaattcagt acatgcttac aaaaaagcag gaacatataa tgttacatta 2580
aaagtaactg acgataaggg tgcaacagct acagaaagct ttactataga aataaagaac 2640
gaagatacaa caacacctat aactaaagaa atggaacctt atgatgatat aaaagaggct 2700
aatggtccaa tagttgaagg tgttactgta aaagggtgatt taaatgggtc tgatgatgct 2760
gataccttct attttgatgt aaaagaagat ggtgatgtta caattgaact tccttattca 2820
gggtcatcta atttcacatg gttagtttat aaagaggggag acgatcaaaa ccatattgca 2880
agtggtatag ataagaataa ctcaaaagtt ggaacattta aatctacaaa aggaagacat 2940
tatgtgttta tatataaaca cgattctgct tcaaatatat cctattcttt aaacataaaa 3000
ggattaggtg acgagaaatt gaaggaaaaa gaaaataatg attcttctga taaagctaca 3060
gttataccaa atttcaatac cactatgcaa ggttcacttt taggtgatga ttcaagagat 3120
tattattctt ttgagggtta ggaagaaggc gaagttaata tagaactaga taaaaggat 3180
gaatttggtg taacatggac actacatcca gagtcaaata ttaatgacag aataacttac 3240
ggacaagttg atggtataa ggtatctaata aaagttaaat taagaccagg aaaatattat 3300
ctacttggtt ataaatactc aggatcagga aactatgagt taagggtaaa taaataa 3357

```

<210> 4

<211> 330

5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> péptido señal colagenasa G

10

<400> 4

```

atgaaaaaaa atattttaaa gattcttatg gatagttatt ctaaagaatc taaaattcaa 60
actgtacgta gggttacgag tgtatcactt ttagcgggtat atcttactat gaatacttca 120
agtttagttt tagcaaaacc aatagaaaat actaatgata ctagtataaa aaatgtggag 180
aaattaagaa atgctccaaa tgaagagaat agtaaaaagg tagaagatag taaaaatgat 240
aaggtagaac atgtgaaaaa tatagaagag gcaaagggtg agcaagttgc acccgaagta 300
aaatctaaat caactttaag aagtgttctt

```

<210> 5

15

<211> 110

38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> péptido señal colagenasa G

<400> 5

Met Lys Lys Asn Ile Leu Lys Ile Leu Met Asp Ser Tyr Ser Lys Glu
 1 5 10 15

Ser Lys Ile Gln Thr Val Arg Arg Val Thr Ser Val Ser Leu Leu Ala
 20 25 30

Val Tyr Leu Thr Met Asn Thr Ser Ser Leu Val Leu Ala Lys Pro Ile
 35 40 45

Glu Asn Thr Asn Asp Thr Ser Ile Lys Asn Val Glu Lys Leu Arg Asn
 50 55 60

Ala Pro Asn Glu Glu Asn Ser Lys Lys Val Glu Asp Ser Lys Asn Asp
 65 70 75 80

Lys Val Glu His Val Lys Asn Ile Glu Glu Ala Lys Val Glu Gln Val
 85 90 95

Ala Pro Glu Val Lys Ser Lys Ser Thr Leu Arg Ser Ala Ser
 100 105 110

10 <210> 6

<211> 3066

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15 <220>

<223> colagenasa H y péptido señal

<400> 6

atgaaaagga aatgtttatc taaaaggctt atgttagcta taacaatggc tacaatattt	60
acagtgaaca gtacattacc aatttatgca gctgtagata aaaataatgc aacagcagct	120
gtacaaaatg aaagtaagag gtatacagta tcatatttaa agactttaa ttattatgac	180
ttagtagatt tgcttgtaa gactgaaatt gagaatttac cagaccttt tcagtatagt	240
tcagatgcaa aagagttcta tggaaataaa actcgtatga gctttatcat ggatgaaatt	300
ggtagaaggg cacctcagta tacagagata gatcataaag gtattcctac ttagtagaa	360
gttgtaagag ctggatttta cttaggattc cataacaagg aattgaatga aataaacaag	420
aggtctttta aagaaaggg aataccttct atattagcaa ttcaaaaaa tcctaatttt	480
aaactaggta ctgaagtcca agataaaata gtatctgcaa caggactttt agctggtaat	540
gaaacagcgc ctccagaagt tgtaaataat ttacaccaa tacttcaaga ctgtataaag	600
aatatagaca gatacgtct tgatgattta aagtcaaaag cattatttaa tgtttagct	660
gcacctacct atgatataac tgagtattta agagctacta aagaaaaacc agaaaacact	720

ccttggtatg gtaaaataga tgggtttata aatgaactta aaaagttagc tctttatgga	780
aaaataaatg ataataactc ttggataata gataacggta tatatcatat agcaccttta	840
gggaagttac atagcaataa taaaatagga atagaaactt taacagaggt tatgaaagtt	900
tatccttatt taagtatgca acattttaca tcagcagatc aaattaagcg tcattatgat	960
tcaaaagatg ctgaaggaaa caaaatacct ttagataagt ttaaaaagga aggaaaagaa	1020
aaatactgtc caaaaactta tacatttgat gatggaaaag taataataaa agctggtgct	1080
agagtagaag aagaaaaagt taaaagacta tactgggcat caaaggaagt taactctcaa	1140
ttcttttagag tatacggaat agacaaacca ttagaagaag gtaatccaga tgatatatta	1200
acaatgggta tctacaacag tcccgaagaa tataaactca atagtgttct atacggatat	1260
gatactaata atggtggtat gtatatagag ccagaaggaa ctttcttcac ctatgaaaga	1320
gaagctcaag aaagcacata cacattagaa gaattattta gacatgaata tacacattat	1380
ttgcaaggaa gatatgcagt tccaggacaa tggggaagaa caaaacttta tgacaatgat	1440
agattaactt ggtatgaaga aggtggagca gaattatttg caggttctac tagaacttct	1500
ggaatattac caagaaagag tatagtatca aatattcata atacaacaag aaataataga	1560
tataagcttt cagacactgt acattctaaa tatggtgcta gttttgaatt ctataattat	1620
gcatgtatgt ttatggatta tatgtataat aaagatatgg gtatattaaa taaactaaat	1680
gatcttgcaa aaaataatga tgttgatgga tatgataatt atattagaga ttttaagttct	1740
aattatgctt taaatgataa atatcaagat catatgcagg agcgcataga taattatgaa	1800
aatttaacag tgccctttgt agctgatgat tatttagtaa ggcatgctta taagaacctt	1860
aatgaaattt attctgaaat atctgaagta gcaaaattaa aggatgctaa gagtgaagtt	1920
aagaaatcac aatatttttag tacctttact ttgagaggta gttacacagg tggagcatct	1980
aaggggaaat tagaagatca aaaagcaatg aataagttta tagatgattc acttaagaaa	2040
ttagatacgt attcttgagg tgggtataaa actttaactg cttatttcac taattataaa	2100
gttgactctt caaatagagt tacttatgat gtagtattcc acggatatatt accaaacgaa	2160
ggtgattcca aaaattcatt accttatggc aagatcaatg gaacttaca gggaaacagag	2220
aaagaaaaaa tcaaattctc tagtgaaggc tctttcgatc cagatggtaa aatagtttct	2280
tatgaatggg atttcggaga tggttaataag agtaatgagg aaaatccaga gcattcatat	2340
gacaaggtag gaacttatac agtgaaatta aaagttactg atgacaaggg agaactttca	2400
gtatctacta ctactgcaga aataaaggat ctttcagaaa ataaacttcc agttatatat	2460
atgcatgtac ctaaattccg agccttaaat caaaaagttg ttttctatgg aaaaggaaca	2520
tatgacccag atggatctat cgcaggatat caatgggact ttggtgatgg aagtgatttt	2580
agcagtgaac aaaacccaag ccatgtatat actaaaaaag gtgaatatac tgtaacatta	2640
agagtaatgg atagtagtgg acaaatgagt gaaaaaacta tgaagattaa gattacagat	2700
ccggtatatc caataggcac tgaaaaagaa ccaaataaca gtaaagaaac tgcaagtgg	2760
ccaatagtag caggtatacc tgttagtgga accatagaaa atacaagtga tcaagattat	2820
ttctattttg atgttataac accaggagaa gtaaaaatag atataaataa attagggtag	2880
ggaggagcta cttgggtagt atatgatgaa aataataatg cagtatctta tgccactgat	2940
gatgggcaaa atttaagtgg aaagttaag gcagataaac caggtagata ttacatccat	3000
ctttacatgt ttaatggtag ttatatgcc a tatagaatta atatagaagg ttcagtagga	3060
agataa	3066

41

<211> 120

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5

<220>

<223> péptido señal

<400> 7

atgaaaagga aatgtttatc taaaaggctt atgttagcta taacaatggc tacaatattt 60

acagtgaaca gtacattacc aatttatgca gctgtagata aaaataatgc aacagcagct 120

10

<210> 8

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> péptido señal

<400> 8

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met
1 5 10 15Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val
20 25 30

20

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala
35 40

PATENTKRAV

- 5 **1.** Produkt valgt fra gruppen bestående av en sammensetning og et delekit
hvor i produktet omfatter rekombinant kollagenase G og rekombinant
kollagenase H med et masseforhold mellom 1:2,5 og 1:3,5.
- 2.** Produktet ifølge krav 1, hvor i masseforholdet mellom rekombinant
kollagenase G og rekombinant kollagenase H er ca. 1:3.
- 10 **3.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–2, hvor i den
rekombinante kollagenase G har aminosyresekvensen i SEQ ID NO: 1 med en
6-histidintag lokalisert ved C-terminalen.
- 4.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–3, hvor i den
15 rekombinante kollagenase H har aminosyresekvensen i SEQ ID NO: 2 med en
6-histidintag lokalisert ved C-terminalen.
- 5.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–4, hvor i produktet er en
farmasøytisk sammensetning omfattende en farmasøytisk akseptabel bærer.
- 20 **6.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–5, ytterligere omfattende
en annen aktiv ingrediens.
- 7.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–6, hvilket omfatter én
25 eller flere sammensetninger i form av: plastere, salve, pasta, krem, løsning,
suspensjon, emulsjon, lotion, liniment, gelé, gel, skum, pulver eller hvilken
som helst kombinasjon derav.
- 8.** Produktet ifølge krav 7, hvor i den ene eller flere sammensetninger er i form
30 av en gel.
- 9.** Produktet ifølge krav 8, omfattende hyaluronsyre i konsentrasjoner mellom
0,05 % og 4 %.
- 35 **10.** Produktet ifølge krav 9, hvor i konsentrasjonene av kollagenaser er høyere
enn 400 CDU/mg hyaluronsyre.

- 11.** Produktet ifølge krav 10, hvori konsentrasjonene av kollagenaser ligger mellom 450 og 5000 CDU/mg hyaluronsyre.
- 5 **12.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 9–11, hvori hyaluronsyren har en molekylvekt mellom 500 og 5000 kDa.
- 13.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–12, for anvendelse som medikament.
- 10 **14.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–12, for anvendelse som medikament, hvori produktet er et delesett, og hvori den rekombinante kollagenase G administreres før den rekombinante kollagenase H.
- 15 **15.** Produktet ifølge et hvilket som helst av kravene 1–12, for anvendelse i behandlingen av sykdommer som involverer bindevevsendringer.
- 16.** Produktet for anvendelse ifølge krav 15, hvori sykdommen er fibromatose.
- 20 **17.** Produktet for anvendelse ifølge krav 16, hvori fibromatosen er valgt fra listen som inkluderer: palmar Dupuytren's kontraktur, La Peyronies sykdom, Ledderhoses sykdom eller plantar fascial fibromatose eller retrakte arr.

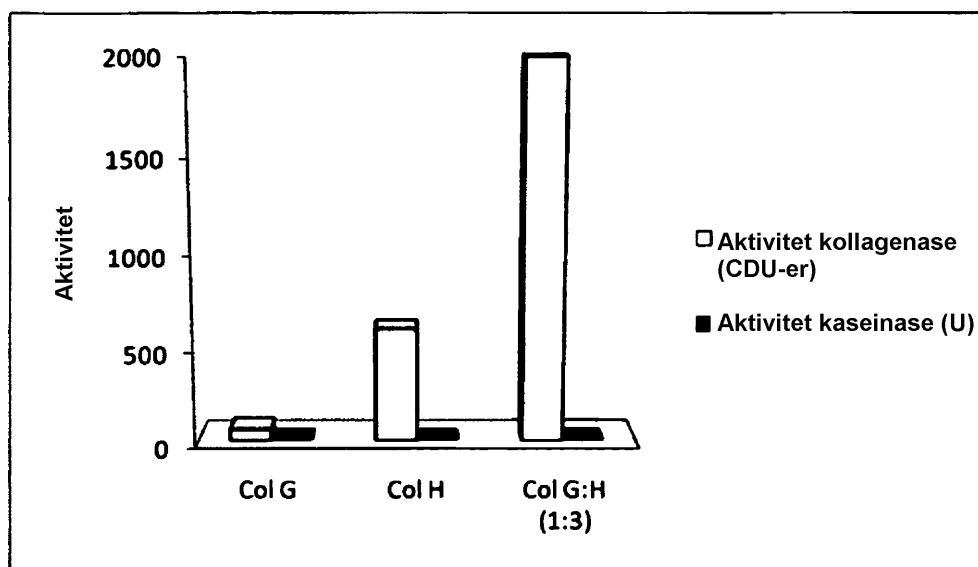


FIG. 1

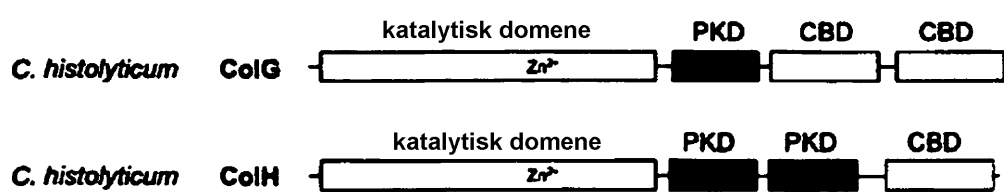
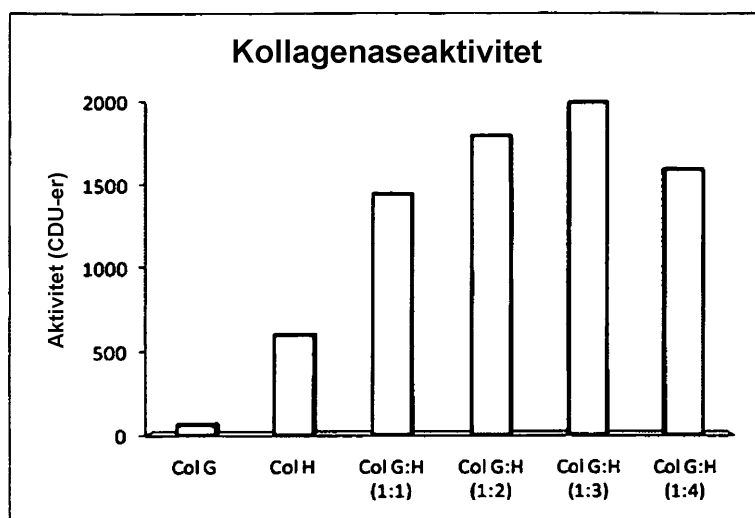
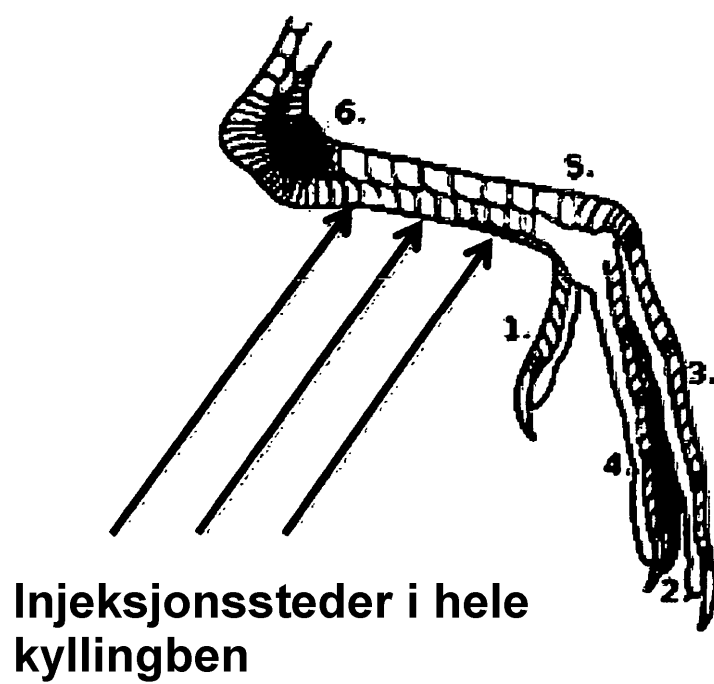


FIG. 2

**FIG. 3****FIG. 4**

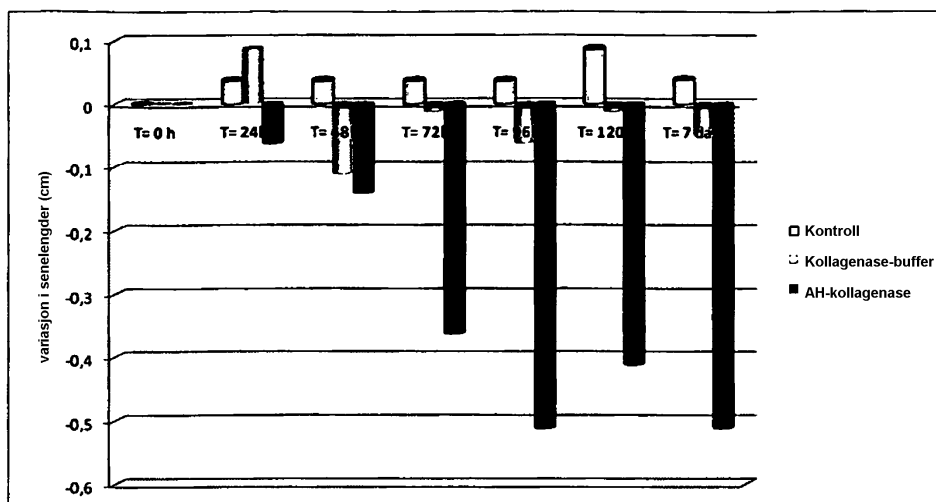


FIG. 5

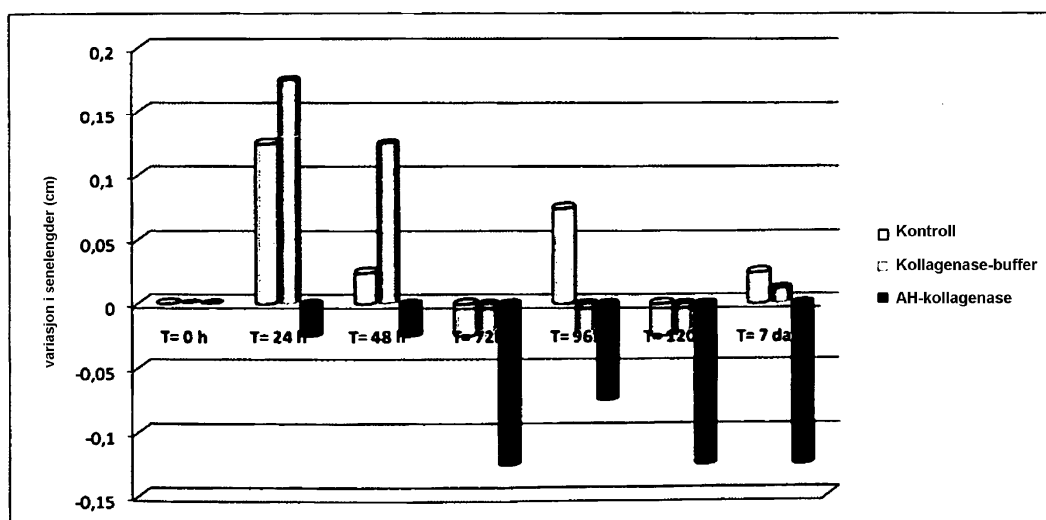


FIG. 6