(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 692 419**

(51) Int. CI.:

A61K 38/47 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2015 PCT/US2015/014837**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2015 WO15120284**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2015 E 15706592 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3102228**

(54) Título: **Soluciones hipoalérgenas ultrapuras de sacrosidasa**

(30) Prioridad:

07.02.2014 US 201414175263

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2018

(73) Titular/es:

QOL MEDICAL LLC (100.0%)
4445 North Highway A1A,
Vero Beach, Florida 32963, US

(72) Inventor/es:

REARDAN, DAYTON T. y
SEEKAMP, CHRISTOPHER

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Soluciones hipoalérgenas ultrapuras de sacrosidasa

Antecedentes de la invención

La agenesia de sacarosa-isomaltasa (CSID) es una enfermedad crónica, autosómica recesiva, hereditaria, fenotípicamente heterogénea con actividad enzimática variable. La CSID generalmente se caracteriza por un sujeto que tiene una falta completa o casi completa de actividad de sacarasa endógena humana, junto con una reducción muy marcada en la actividad de isomaltasa, una disminución moderada de la actividad de maltasa y el sujeto puede tener cantidades normales o anormales de lactasa.

La enzima humana sacarasa-isomaltasa se produce de forma natural en el borde en cepillo del intestino delgado, principalmente el duodeno distal y el yeyuno. La enzima humana natural hidroliza el disacárido sacarosa en sus componentes monosacáridos, glucosa y fructosa. La isomaltasa descompone los disacáridos del almidón en azúcares simples.

En ausencia de enzima endógena humana sacarasa-isomaltasa, como en la CSID, la sacarosa no se metaboliza. La sacarosa y el almidón sin hidrolizar no se absorben en el intestino y su presencia en la luz intestinal conduce a la retención osmótica de agua. Esto puede provocar heces blandas o diarrea. La sacarosa no absorbida en el colon es fermentada por la flora bacteriana para producir mayores cantidades de hidrógeno, metano y agua. Como consecuencia, puede producirse un exceso de gases, hinchazón, calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarrea explosiva. La absorción defectuosa crónica de disacáridos puede producir desnutrición. Los pacientes con CSID no diagnosticados/no tratados con frecuencia no crecen y se quedan atrás en sus curvas de desarrollo y crecimiento esperadas. Antes de la aprobación de la FDA del producto de reemplazo comercial solución oral Sucraid® (sacrosidasa), el tratamiento de CSID ha requerido el uso continuado de una dieta estricta sin sacarosa con éxito limitado en el tratamiento de la enfermedad.

Actualmente, la CSID se trata por administración oral, con comidas, de una solución de sacrosidasa en glicerol-agua (1:1 p/p), que proporciona el tratamiento restitutivo de la enzima para la CSID. Esta solución se comercializa como Sucraid® (sacrosidasa) en solución oral distribuida por QOL Medical LLC. Cada mililitro (ml) de Sucraid® contiene 8.500 Unidades Internacionales (U.I.) de la enzima sacrosidasa, el principio activo. El nombre químico de esta enzima es β,D-fructofuranósido fructohidrolasa. La enzima procede de la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), por digestión enzimática con papaína.

El producto Sucraid® era típico de la época con respecto a la pureza. La especificación de pureza fijada por la FDA no fue inferior al 85% en la(s) banda(s) principal (es) mediante un análisis de densitometría SDS-PAGE reducida después de la tinción con Coomassie. Esta es una relación de bandas de sacrosidasa a otras proteínas de aproximadamente 6:1.

La FDA especificó que la pureza no comprendía más de 10 µg/ml de papaína en la sustancia farmacéutica sacrosidasa. La "sustancia farmacéutica" es la solución precursora glicerol:agua de sacrosidasa que puede diluirse más y envasarse para producir Sucraid®, que se conoce como el "producto farmacéutico" acabado. La etiqueta original aprobada por la FDA en 1998 notificó el potencial para reacciones alérgicas, y advirtió a los médicos para que trataran pacientes con CSID por primera vez dentro de su unidad en caso de que surgieran reacciones alérgicas. Nuevamente, en 2008, como resultado de un cambio de sitio del fabricante de la sustancia farmacéutica, la FDA solo aprobó el relanzamiento de este medicamento con la imposición de una Estrategia de Evaluación y Mitigación de Riesgos (REMS) que solo exige la FDA para medicamentos con posibilidad de problemas de seguridad graves.

Se ha publicado que la estructura primaria de sacrosidasa consiste en 513 aminoácidos con un peso molecular aparente de 100.000 g/mol para el monómero glucosilado (intervalo 60,000-116,000 g/mol). Los informes también sugieren que la proteína existe en solución como un monómero, dímero, tetrámero y octómero que varía de 100.000 g/mol a 800.000 g/mol. Tiene un punto isoeléctrico de 4,1 (pI = 4,093).

Actualmente, Sucraid® se suministra en botellas que contienen 118 ml de la solución de sacrosidasa. Una dosis típica es 1 o 2 ml con cada comida o aperitivo. La solución se embotella de forma aséptica; sin embargo, puede contaminarse después de la abertura debido a la necesidad de administración frecuente, por lo que los pacientes deben desechar la botella 4 semanas después de la apertura.

Compendio de la invención

Esta invención proporciona una sacrosidasa hipoalérgica ultrapura que cumple con las normas farmacéuticas para uso de prescripción humana. La sacrosidasa también se mejora organolépticamente, ya que sus soluciones acuosas son inodoras.

Una realización proporciona una composición proteica que consiste en sacrosidasa y que no contiene otras proteínas según se determina por SDS-PAGE de hasta aproximadamente 15 µg de dicha composición. Las técnicas de SDS-PAGE, descritas a continuación en la presente memoria, pueden emplear condiciones reductoras y tinción con azul de Coomassie. Por lo tanto, una realización proporciona una composición de proteína que consiste esencialmente en sacrosidasa que tiene una relación en la franja de volumen de sacrosidasa a otras proteínas de al menos aproximadamente 35: 1, p. ej., aproximadamente 35-55:1, según se determina por SDS-PAGE de aproximadamente 20 µg de dicha composición. La composición de proteína de una realización se produce por un proceso (reivindicado) que comprende la diafiltración del producto de la digestión de levadura y no emplea la purificación cromatográfica de dicha sacrosidasa.

Otra realización proporciona una sustancia farmacéutica y un producto farmacéutico que consiste esencialmente en una solución de sacrosidasa en agua que comprende aproximadamente 45-54% en peso de glicerol y que contiene menos de aproximadamente 10 ng/ml, preferiblemente menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de papaína en combinación con al menos aproximadamente 7.500 UI/ml de sacrosidasa. Una realización proporciona una solución que consiste esencialmente en al menos aproximadamente 7.500-9.500 UI/ml, preferiblemente alrededor de 8.500 UI/ml de sacrosidasa en aproximadamente 1:1 de glicerol:agua que contiene menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de papaína. Esta formulación de sacrosidasa no provoca una reacción alérgica en un ser humano tal como un paciente con CSID, cuando se administra a una dosis de hasta aproximadamente 2,0 ml (dosis diarias de 2-10 ml).

Otra realización proporciona una solución de sacrosidasa en agua/glicerol que tiene una actividad de al menos aproximadamente 10.000 UI/ml y que tiene menos de aproximadamente 10 ng/ml de papaína residual. En una realización, la solución tiene una relación de aproximadamente 1: 1 en peso de agua a glicerol. En otra realización, la solución tiene un pH de aproximadamente 4,1-4,5.

La cantidad de papaína puede determinarse por las técnicas de ELISA. La solución tampoco se produce por un proceso que comprende la purificación cromatográfica de dicha sacrosidasa.

Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" pretende abarcar la variación en el parámetro mencionado, tal como concentración, pH, actividad enzimática, tiempo y similares que el experto en la técnica reconocería como necesariamente inherente en la determinación del parámetro, p. ej., véase la figura 1.

Se puede encontrar información adicional sobre Sucraid® y sacrosidasa en el documento US2014250942.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama de flujo del proceso actual de fabricación de la sustancia farmacéutica sacrosidasa.

Figura 2. Gel de SDS-PAGE con carga óptima teñido con azul de Coomassie. Sustancia farmacéutica a granel Sacrosidasa (Fig. 1) de dos fabricantes (5 µg de proteína). Carril 1: Marcador de P.M. de intervalo bajo 17, 28, 34, 40, 73 y 102 kD; carril 2: Patrón de referencia C4546; carril 3: STS-199NS; carril 4: STS-220NS; carril 5: STS-241NS; carril 6: 125275; carril 7: 125434; carril 8: 125722; carril 9: Patrón de referencia C3955; carril 10: Marcador de P.M. de intervalo amplio (21, 34, 45, 66, 97 kD y 200 kD).

Figura 3. Gel de SDS-PAGE sobrecargado teñido con Coomassie. Sustancia farmacológica a granel Sacrosidasa de dos fabricantes (20 µg de proteína). Carril 1: Marcador de P.M. de intervalo bajo; carril 2: Patrón de referencia C4546; carril 3: STS-199NS; carril 4: STS-220NS; carril 5: STS-241NS; carril 6: 125275; carril 7: 125434; carril 8: 125722; carril 9: Patrón de Referencia C3955; carril 10: Marcador de P.M. de intervalo amplio.

Figura 4. Gel natural sobrecargado teñido con Coomassie. Sustancia farmacéutica a granel Sacrosidasa de dos fabricantes (15 µg de proteína). carril 1: Patrón de referencia C4546; carril 2: STS-199NS; carril 3: STS-220NS; carril 4: STS-241NS; carril 5: 125275; carril 6: 125434; carril 7: 125722; carril 8: Patrón de referencia C3955.

Figura 5. La estructura primaria de aminoácidos de Sacrosidasa consiste en 513 aminoácidos. Sacrosidasa tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra más adelante (SEQ ID n°: 1).

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona una sacrosidasa hipoalérgica ultrapura que cumple las normas farmacéuticas para su uso en la prescripción humana, con propiedades alérgenas reducidas. La sacrosidasa también está organolépticamente mejorada, ya que sus soluciones acuosas son inodoras. Las soluciones de sacrosidasa que son menos puras pueden presentar propiedades organolépticas desagradables, como un olor a "levadura", un color desagradable y otros olores.

Nombres comunes: invertasa, sacrosidasa

Nombre comercial: Sucraid ® (sacrosidasa) solución oral (Producto farmacéutico)

USAN:	Sacrosidasa
Producto químico:	β-D-fructofuranosida fructohidrolasa
Sinónimos:	β-D-fructofuranosidasa β-D-fructofuranosidasa β-fructofuranosidasa β-fructofuranosida fructohidrolasa β-fructopiranosidasa β-fructosidasa β-invertasa Fructosilinvertasa Invertasa Invertina Glucosucrasa Sacarasa Sucrasa Sacarosa hidrolasa Exo-β-(2,6)-fructofuranosidasa Maxivert L 1000 Levadura sucrasa (YS)
Número CAS:	85897-35-4 9001-57-4

Compendio del proceso de purificación

Esta invención proporciona un procedimiento sin cromatografía para producir proteína sacrosidasa ultrapura que cumple con las normas farmacéuticas para su uso en la prescripción humana. Nunca antes se ha desarrollado un método no cromatográfico para producir dicha proteína de ultra alta pureza, concretamente sacrosidasa, superando defectos anteriores debido a una pureza inadecuada. Un proceso de purificación no cromatográfico genera ahorros significativos de tiempo y costes durante la fabricación. En la presente memoria se proporciona el estudio de caracterización del fármaco, las pruebas de pureza y por último la prueba clínica de la formulación hipoalérgena única mejorada.

Las etapas de una realización preferida del presente procedimiento de aislamiento y purificación de sacrosidasa se resumen en la figura 1.

1. Exprimir levadura *Saccharomyces cerevisiae* con papaína en una solución acuosa amortiguada a un pH de aproximadamente 7,0 y a una temperatura de aproximadamente 30-34ºC.

2. La digestión con papaína escinde todas las proteínas en fragmentos de pequeño peso molecular que luego pueden ser filtrados de forma eficaz lejos de la enzima sacrosidasa muy grande, resistente a la papaína, que en solución tiene un peso molecular de solución natural aparente de 500.000+ gramos por mol (Daltons). La sacrosidasa que tiene la glucosilación extensa producida en la levadura es resistente a la digestión con papaína.

3. Se prefiere el uso de tierra de diatomeas con dos tamaños diferentes de poro y/o partícula para eliminar la mayoría de los componentes insolubles y probablemente otras impurezas solubles e insolubles. Al pH, fuerza iónica y concentraciones elegidas, se produce un gran aumento de la pureza utilizando estas dos etapas en serie que también preparan la solución libre de partículas resultante para la diafiltración. La eliminación de componentes insolubles también evita que se obstruyan los filtros de membrana de diálisis en la unidad de ultrafiltración. Esto aumenta la velocidad de tratamiento.

4. Diafiltración usando un filtro de tamaño de poro óptimo determinado experimentalmente para equilibrar la pureza con el rendimiento. El presente proceso emplea un filtro de umbral mínimo de 40 kiloDalton para conseguir una solución inodora ultrapura hipoalérgena de sacrosidasa. La solución tiene una actividad sacrosidasa de al menos aproximadamente 22.000 UI/ml, preferiblemente al menos aproximadamente 17.000 UI/ml. Los filtros de poro más grandes dan una pureza equivalente, pero a costa del rendimiento. Los filtros de tamaño de poro más pequeño no proporcionan suficiente pureza final. También se determinó experimentalmente el número de volúmenes de lotes contra los cuales diafiltrar: solo 4 volúmenes más de diafiltración permiten una pureza adecuada para cumplir los requisitos de una sustancia farmacéutica a granel regulada para uso farmacéutico humano.

5. La formulación final de la sustancia farmacéutica con glicerol, emplea preferiblemente filtración estéril para garantizar la carga biológica del lote que cumple con las normas de la FDA. La sustancia farmacéutica se almacena en tambores a aproximadamente -18ºC a -25ºC para el almacenamiento a largo plazo, hasta que se procesa/ajusta la concentración/se envasa para producir el producto farmacéutico Sucraid®. En este momento, la actividad sacrosidasa es de al menos aproximadamente 10.000 UI/ml.

La invención se describirá además haciendo referencia a los siguientes ejemplos detallados, en donde los términos "SDS-PAGE" y "ELISA" como se emplean en la presente memoria se definen con referencia a las técnicas siguientes.

Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras de la sustancia farmacéutica a granel sacrosidasa que contienen cantidades predeterminadas de proteína total, fueron analizadas por Charles Rivers Laboratory, Malvern, PA. y los ensayos fueron validados por Tekagen, Inc., Malvern, PA.

Para separar mezclas de polipéptidos (en un campo eléctrico) en bandas distintas se utiliza SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida) reductora. La movilidad en estas condiciones viene determinada principalmente por el tamaño molecular. La tinción con azul de Coomassie coloidal permite el análisis visual y/o densimétrico de las bandas resueltas. Este método es lineal para cargas de 0,25 µg a 15 µg con un límite de detección inferior de 0,1 µg por banda, p. ej., los límites de detección y cuantificación de sacrosidasa se determinaron en 0,1 µg. El área de la banda de sacrosidasa medida está correlacionada linealmente con la carga de proteína.

En los ensayos a continuación en la presente memoria, las muestras descritas que contienen sacrosidasa se redujeron con 2-mercaptoetanol en amortiguador de muestra SDS. Las muestras se ajustaron a aproximadamente 1,0 mg/ml con agua y se trataron con un volumen del mercaptoetanol en amortiguador SDS a 100ºC durante 3 min. para desnaturalizar/reducir la proteína. Las muestras se procesaron en un XCell SureLock Mini-Cell® (Invitrogen) usando Novex® 4·20% de gel Tris-Glicina (Invitrogen) usando un amortiguador corriente de SDS durante 90 min. a 120 voltios. Los geles se tiñeron con Coomassie Blue y se lavaron con agua. Se exploraron los geles utilizando un densímetro SI personal (Molecular Dynamics).

Análisis cuantitativo de papaína mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA)

muestras de la sustancia farmacéutica a granel sacrosidasa se dializaron contra PBS y toda la papaína se inhibió con E-64. Warnex Laboratories, Quebec, Canadá, analizó el contenido de papaína de la muestra usando un ELISA cuantitativo de tipo sándwich. Un anticuerpo de captura policlonal (conejo) específico para papaína se recubre en cada pocillo de una microplaca. Cuando está presente en las muestras, la papaína se une al anticuerpo de captura. Se agrega un segundo anticuerpo anti-papaína (cabra) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) que se une a toda la papaína capturada. Después del lavado, se añade el sustrato O-fenilendiamina con 0,03% de H_2O_2 para producir una reacción de color enzimático con HRP. La reacción se detiene con una solución de ácido sulfúrico (solución de parada). La intensidad de color formada por la reacción enzimática se mide por espectrofotometría.

La cantidad de papaína en las muestras se calculó en base a una curva patrón, donde los valores medios de la D.O. de cada uno de los patrones están en el eje Y y la concentración correspondiente de papaína está en el eje X. Para determinar la concentración final de papaína en las muestras, la concentración obtenida de la curva patrón se multiplica por el factor de dilución. La cantidad de papaína se calcula automáticamente mediante el programa informático Gen5. El límite inferior de cuantificación de la papaína es 3,13 ng/ml. El límite inferior de detección de la papaína es de 1,56 ng/ml.

Ejemplo 1: Procedimiento de fabricación de sacrosidasa ultrapura

Se carga agua desionizada (1.700 kg) en un reactor de 3.785 litros (1.000 galones) y se calienta a 32 ± 2ºC, momento en el que se agrega levadura *Saccharomyces cerevisiae* (360 kg) y la suspensión se mezcla durante 20-30 minutos. Se compreba el pH y si se encuentra por debajo de 6,9, se ajusta el pH usando una solución de hidróxido de sodio al 25% hasta que el pH sea de 7,0 ± 0,1.

Se agrega papaína (3,4 kg) 100 TU/mg seguido de peróxido de hidrógeno (35%, 2.8 kg). La suspensión se agita a 32 ± 2ºC durante las siguientes 17,5 a 20 h; después de cada 3,5-4 h el pH se ajusta a 7,0 ± 0,1 y se agrega peróxido de hidrógeno (34%, 2,8 kg por porción, 11,2 kg en total).

Una vez transcurridas las 17,5-20 horas de mezcla, la mezcla se enfría a entre 22ºC y 26ºC, en cuyo momento se agregan 25 kg de ácido fosfórico al 85% durante 20-30 min. Se comprueba el pH de la suspensión y el pH se ajusta más a 4,0 ± 0,1 añadiendo ácido fosfórico al 85%.

Se agrega a la mezcla tierra de diatomeas (Celpure® S1000, 210 kg), seguido de 700 kg más de agua desionizada y la suspensión se mezcla durante 30-40 minutos. La lechada se filtra en cuatro partes iguales a través de un filtro Sparkler para eliminar los restos de células y cualquier otro sólido del producto en solución. Para cada porción de la filtración, una vez se detiene el ritmo de recolección de filtrado, el haz de filtros se lava con agua desionizada fresca (400 kg). Estos lavados se combinan con los filtrados iniciales.

Una vez completada la cuarta filtración, los filtrados y lavados combinados se devuelven al reactor de 3.785 litros (1.000 galones) y se tratan con peróxido de hidrógeno (34%, 2,0 kg). La solución se decolora mediante tratamiento con carbón activado (malla 20x40, 60 kg) y sulfato de aluminio (9,4 kg); la lechada resultante se mezcla durante 1,5-2 h.

Se agrega tierra de diatomeas (Celpure® S100, 32 kg) y se mezcla durante otros 30 min. Los sólidos se eliminan por filtración a través del filtro Sparkler. El reactor se limpia para eliminar los sólidos residuales que puedan estar presentes y el filtrado de la decoloración se devuelve al reactor a través de un filtro en línea de 0,2 micras. La solución se concentra luego a aproximadamente 250 kg usando una unidad de ultrafiltración que ha sido equipada con filtros de umbral de 40 kilo-Dalton.

La solución concentrada de sacrosidasa se purifica luego por diafiltración contra al menos cuatro volúmenes (~1000 l) de solución amortiguadora de ácido cítrico. Esta solución amortiguadora se prepara a partir de agua desionizada (1000 kg), ácido cítrico (9,2 kg), citrato de sodio (11,2 kg) y el pH de la solución se ajusta a 4,6 ± 0,1 mediante la adición de hidróxido de sodio al 25%. Se pueden usar más volúmenes de amortiguador para aumentar la pureza proteica general mientras se continúan reduciendo las cantidades residuales de impurezas en la solución formulada final. Por lo general, cuatro volúmenes (~1000 l) de amortiguador de ácido cítrico han sido suficientes durante la diafiltración para purificar la proteína sacrosidasa retenida en la solución a > 99% de pureza y para conseguir concentraciones de papaína <50 ppb.

Una vez completada la diafiltración, la solución se concentra aún más hasta que el material tiene un valor de ensayo ≥ 26,000 UI/ml en la prueba de ensayo de sacrosidasa. Luego se comprueba el pH de la solución y se ajusta a 4,3 ± 0,1 mediante el uso de una solución de hidróxido de sodio al 25% si el pH es <4,15 o mediante el uso de ácido fosfórico al 85% si el pH de la solución es > 4,45.

Una vez completado el ajuste del pH, la solución se transfiere a un recipiente de mezclado y se agrega aproximadamente el mismo peso de glicerina para producir la sustancia farmacéutica sacrosidasa. La solución acuosa resultante de glicerina se mezcla durante 10 minutos. La sustancia farmacéutica elegida como objetivo tiene > 10,000 UI/ml de sacrosidasa y aproximadamente 45-54% en peso de glicerol. Una vez completada la mezcla, la solución se transfiere a los tambores a través de dos filtros en línea de nailon de 0,2 micras que se configuran en serie. La solución en tambores o "sustancia farmacéutica" se almacena a temperatura ambiente durante 8-36 h antes de ser trasladada a un almacenamiento a largo plazo a aproximadamente -20°C. Las porciones se pueden extraerse a medida que se necesite y diluir y envasar para producir el producto farmacéutico Sucraid®.

Ejemplo 2: Gel de SDS-PAGE reducido y teñido con azul Coomassie con carga óptima de densitometría:

El gel que se muestra en la figura 2 es un SDS-PAGE reducido, teñido con Coomassie que compara 3 lotes de un fabricante anterior de sacrosidasa (carriles 3, 4 y 5) que se fabricó con un proceso de fabricación anterior, con 3 lotes de sacrosidasa (carriles 6, 7 y 8) fabricados usando el nuevo proceso de fabricación hipoalérgeno ultrapuro. El patrón de referencia C4546 es el patrón de referencia actualmente en uso y se produjo a partir del proceso anterior. El patrón de referencia C3955 es un patrón de referencia aún más antiguo del fabricante de Sacrosidasa original.

La exploración de densitometría de este gel de SDS-PAGE con carga óptima se muestra a continuación (tabla 1). Estos resultados demuestran claramente que la sacrosidasa fabricada usando el nuevo procedimiento es ultrapura, sin impurezas proteicas detectables. La validación de cGMP de este método fijó un límite de detección inferior a 0,1 microgramos.

Tabla 1

Tipo de ejemplo	Numero de lote	carril n°	Banda n°	Volumen de banda	% de densidad
Patrón de referencia	C4546	2. 2.	1. 2.	1823 110	94,31 5,69
Procedimiento antiguo	STS-199NS	3. 3.	1. 2.	2376 127	94,93 5,07
Procedimiento antiguo	STS-220NS	4. 4.	1. 2.	2822 154	94,83 5,17

Procedimiento antiguo	STS-241NS	5. 5.	1. 2.	2590 152	94,46 5,54
Nuevo proceso	125275	6.	1.	2356	> 99,9
Nuevo proceso	125434	7.	1.	2331	> 99,9
Nuevo proceso	125722	8.	1.	2159	> 99,9
Patrón de referencia*	C3955	9.	1.	2256	> 99,9

* Purificado por cromatografía. Muestra experimental solamente

Ejemplo 3: Gel de SDS-PAGE reducido y teñido con Coomassie con gel sobrecargado de densitometría

En un segundo protocolo, los geles de SDS-PAGE reducidos se sobrecargaron con 20 µg de proteína (figura 3). En los geles teñidos con Coomassie, una pequeña banda de impurezas es visible en la presente sustancia farmacéutica sacrosidasa, pero la pureza absoluta de la sacrosidasa de la invención (~97%, carriles 6, 7 y 8) es aún superior a la sacrosidasa anterior (~ 90%, carriles 3, 4, 5). La tabla 2 resume la información de este gel.

Tabla 2

Tipo de muestra	**Lote de muestra**	**Cantidad proteína (µg)**	**Carril n°**	**Banda n°**	**Ref. Banda**	**Volumen banda**	**Suma banda**	**Densidad %**
Patrón de referencia	C4546	20	2. 2.	1. 2.	0,151 0,561	4419 448	4867	90,80 9,20
Procedimiento antiguo	STS-199NS	20	3. 3.	1. 2.	0,145 0,568	5063 525	5588	90,60 9,40
Procedimiento antiguo	STS-220NS	20	4. 4.	1. 2.	0,132 0,559	5460 509	5969	91,47 8,53
Procedimiento antiguo	STS-241NS	15	5. 5.	1. 2.	0,132 0,550	4577 426	5003	91,49 8,51
Procedimiento nuevo	125275	15	6. 6.	1. 2.	0,126 0,542	5157 135	5292	97,45 2,55
Procedimiento nuevo	125434	15	7. 7.	1. 2.	0,134 0,546	4820 116	4936	97,65 2,35
Procedimiento nuevo	125722	15	8. 8.	1. 2.	0,128 0,550	4832 99	4931	97,99 2,01
Patrón de referencia	C3955	15	9. 9. 9. 9. 9. 9. 9.	1. 2. 3. 4. 5. 6. 7.	0,257 0,450 0,490 0,554 0,609 0,669 0,732	5640 69 135 108 96 143 135	6326	89,16 1,09 2,13 1,71 1,52 2,26 2,13

Ejemplo 4: Geles óptimos y naturales sobrecargados

En un tercer protocolo, se introdujeron muestras no reducidas en geles de PAGE naturales. Tanto la proteína óptima (5 µg de proteína) como la sobrecargada (20, 30 y 60 µg de proteína) se aplicaron a geles de poliacrilamida y luego se tiñeron con azul de Coomassie.

La figura 4 representa un gel natural teñido con Coomassie sobrecargado (15 µg). La exploración por densitometría del gel muestra valores de pureza de 97,59, 99,02 y 99,31 para sacrosidasa realizada por el proceso más antiguo de sacrosidasa y 100%, 100% y 100% para la sacrosidasa fabricada usando el presente proceso ultrapuro. Este gel demuestra claramente la calidad ultrapura de la sacrosidasa fabricada utilizando el nuevo proceso. La tabla 3 resume la información de este gel.

Tabla 3

Tipo de muestra	Lote de muestra	Cantidad proteína (µg)	Carril n°	Banda n°	Ref. Banda	Volumen banda	Suma banda	Densidad %
Referencia	C4546	15	1. 1. 1.	1. 2. 3.	0,170 0,492 0,711	10034 62 71	10167	98,69 0,61 0,70
Procedimiento antiguo	STS-199NS	15	2. 2. 2. 2.	1. 2. 3. 4.	0,115 0,495 0,689 0,896	8926 51 86 83	9146	97,59 0,56 0,94 0,91
Procedimiento antiguo	STS-220NS	15	3. 3.	1. 2.	0,120 0,679	8473 84	8557	99,02 0,98
Procedimiento antiguo	STS-241NS	15	4. 4.	1. 2.	0,150 0,662	8670 60	8730	99,31 0,69
Procedimiento nuevo	125275	15	5.	1.	0,166	9100	9100	100
Procedimiento nuevo	125434	15	6.	1.	0,129	7967	7967	100
Procedimiento nuevo	125722	15	7.	1.	0,141	8605	8605	100
Referencia	C3955	15	8. 8.	1. 2.	0,190 0,573	13693 51	13744	99,63 0,37

Ejemplo 5: Reducción de tres órdenes de magnitud (1.000 veces) en una impureza de proteínas

La FDA retiró todos los productos tópicos de papaína en 2008 debido al riesgo de reacciones de hipersensibilidad (www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116956.htm) y se requirió una REMS para sacrosidasa ese mismo año (www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPientsandProviders/UCM144251.pdf). El presente procedimiento demuestra una impresionante reducción de tres órdenes de magnitud en las concentraciones de papaína de la sustancia farmacéutica a concentraciones casi indetectables con un ELISA muy sensible (LOQ de 3 ng/ml) usando este nuevo procedimiento sin cromatografía. LOQ es el límite de cuantificación. Estos lotes a continuación fueron el resultado final de tres lotes de validación de proceso del presente proceso (lotes 125275, 125897, 125907) frente a lotes de fabricante anterior (STS-199NS, STS-220NS, STS-241NS) que tenían un límite de papaína impuesto por la FDA 10.000 ng/ml.

Tabla 4

Número de lote de sacrosidasa con concentración de papaína inferior en ng/ml					
STS-199NS	STS-220NS	STS-241NS	125275	125897	125907
7300	8050	5470	<3	<3	<3

Este ejemplo muestra el nivel sustancial de reducción de papaína a concentraciones indetectables. La papaína a 23 kilo-Daltons es una proteína marcadora clave que es probablemente representativa de cualquier otra proteína por debajo del límite umbral de 40 KD del filtro de ultrafiltración utilizado, junto con las proteínas escindidas por papaína que caen por encima del límite de peso molecular de 40 KD, con la excepción de sacrosidasa que es resistente a la escisión de papaína en su forma natural tridimensional en solución.

Ejemplo 6: Propiedades organolépticas mejoradas

Mientras se diafiltraba la solución después de la concentración, se le encomendó a un operador que observara el color y el olor de la solución concentrada de sacrosidasa. Como el número de volúmenes de lavado aumentó desde cero volúmenes de lavado de diafiltración hasta cuatro (4) volúmenes de lavado de diafiltración, el operador observó que todo el olor a levadura se eliminó de la solución de sacrosidasa y el color amarillo se redujo drásticamente a casi ningún color amarillo. Estas propiedades organolépticas de esta nueva formulación ultrapura son importantes para la observancia del joven paciente pediátrico ya que el "olor a levadura" no es bien tolerado por algunos pacientes jóvenes lo que lleva a una observancia deficiente con su dosis de Sucraid recetada.

Ejemplo 7: Pruebas clínicas de seguridad mejorada y eficacia continuada

A una paciente con CSID de 5 años de edad se le administró la formulación antigua de Sucraid en agosto de 2012, y fue instruida por el etiquetado aprobado por la FDA (prospecto del envase) debido a la posibilidad de reacciones alérgicas, se la administró la primera dosis en el consultorio de su médico. Este paciente manifestó un caso de urticaria en todo el cuerpo inmediatamente después de administrar la antigua formulación de Sucraid. Por lo tanto, se excluyó una administración adicional con Sucraid. La familia estaba ansiosa por encontrar una solución a los problemas gastrointestinales de sus hijas, por lo que accedieron a un segundo desafío con diferentes lotes de la formulación antigua de Sucraid aproximadamente dos meses después. Una vez más, se manifestó la urticaria, por lo que este paciente se vio imposibilitado permanentemente de utilizar Sucraid aprobado por la FDA y comercializado para tratar su insuficiencia de sacarasa genéticamente determinada.

Una vez desarrollada esta nueva formulación de sacrosidasa hipoalérgena ultrapura, la FDA presentó y autorizó un IND, junto con la aprobación de la Institucional Review Board (IRB) en la Clínica Mayo en Rochester Minnesota para un protocolo de administración de prueba en este mismo paciente en noviembre de 2013. Después tratamiento con la nueva formulación ultrapura hipoalérgena de sacrosidasa, esta paciente de 5 años ya no manifestó reacciones alérgicas o síntomas, incluida la urticaria. Además, después de tomar la nueva formulación ultrapura hipoalérgena de Sucraid sus síntomas de CSID mejoraron completamente, incluida la normalización de 1-2 heces formadas al día frente a > 6+ evacuaciones tipo diarrea acuosa al día, eliminación de su dolor abdominal y eliminación de su distensión abdominal, por lo que este paciente pediátrico ahora puede utilizar esta medicación transformadora para tratar su enfermedad. La nueva formulación ultrapura hipoalérgena de sacrosidasa se está administrando a esta paciente para uso crónico de acuerdo con un IND aprobado por la FDA junto con la aprobación de IRB de Mayo con excelentes resultados para el control de su enfermedad de CSID.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Reardan, Dayton T. Ph.D., RAC Seekamp, Christopher QOL Medical LLC

<120> SOLUCIONES HIPOALEGÉNICAS ULTRAPURAS DE SACROSIDASA

<130> 3482.006WO1

<150> US 14/175,263
<151> 07-02-2014

<160> 1

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 513
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Ser Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His Phe Thr Pro
 1               5                  10                  15
Asn Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr Asp Glu Lys
            20                  25                  30
Asp Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Asp Thr Val
        35                  40                  45
Trp Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Leu Thr
    50                  55                  60
Asn Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg Asn Asp Ser
65                  70                  75                  80
Gly Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn Thr Ser Gly
                85                  90                  95
Phe Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val Ala Ile Trp
            100                 105                 110
Thr Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Leu
        115                 120                 125
Asp Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro Val Leu Ala
    130                 135                 140
Ala Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp Tyr Glu Pro
145                 150                 155                 160
Ser Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Ile
                165                 170                 175
Glu Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu Glu Ser Ala
            180                 185                 190
Phe Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Leu
        195                 200                 205
Ile Glu Val Pro Thr Glu Gln Asp Pro Ser Lys Ser Tyr Trp Val Met
    210                 215                 220
Phe Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Gly Ser Phe Asn Gln
225                 230                 235                 240
Tyr Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala Phe Asp Asn
                245                 250                 255
Gln Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala Leu Gln Thr
            260                 265                 270
Phe Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly Ile Ala Trp
        275                 280                 285
Ala Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn Pro Trp Arg
    290                 295                 300
Ser Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr Glu Tyr Gln
```

```
305                 310                 315                 320
Ala Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu Pro Ile Leu
                325                 330                 335
Asn Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr Asn Thr Thr
            340                 345                 350
Leu Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn Ser Thr Gly
        355                 360                 365
Thr Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr Gln Thr Ile
    370                 375                 380
Ser Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys Gly Leu Glu
385                 390                 395                 400
Asp Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser Ala Ser Ser
                405                 410                 415
Phe Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val Lys Glu Asn
            420                 425                 430
Pro Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro Phe Lys Ser
        435                 440                 445
Glu Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu Asp Gln Asn
    450                 455                 460
Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser Thr Asn Thr
465                 470                 475                 480
Tyr Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn Met Thr Thr
                485                 490                 495
Gly Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val Arg Glu Val
            500                 505                 510
Lys
```

REIVINDICACIONES

1. Una solución de sacrosidasa procedente de *Saccaromyces cerevisiae* en aproximadamente 1:1 de glicerol/agua que tiene una actividad enzimática de al menos aproximadamente 7.500 UI/ml y una concentración de papaína residual de menos de aproximadamente 10 ng/ml de papaína, en donde una dosis diaria de la solución de aproximadamente 2-10 ml al día no provoca una reacción alérgica en un paciente humano aquejado de agenesia de sacarosa-isomaltasa y en donde la estructura primaria de la sacrosidasa es un polipéptido de 513 aminoácidos que está glucosilado.

2. La solución de sacrosidasa de la reivindicación 1, que contiene menos de aproximadamente 3,0 ng/ml de papaína.

3. La solución de sacrosidasa de la reivindicación 1, que no contiene papaína detectable mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima que tiene un límite inferior de cuantificación de 3,13 ng/ml.

4. La solución de sacrosidasa de la reivindicación 1, que no contiene papaína detectable por SDS-PAGE de hasta aproximadamente 15 µg de dicha composición.

5. La solución de sacrosidasa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una actividad enzimática de aproximadamente 7.500-9.500 UI/ml.

6. Sacrosidasa hipoalérgena ultrapura preparada por un procedimiento que comprende:

(a) digerir una suspensión acuosa de *Saccharomyces cerevisiae* a un pH de aproximadamente 7,0 con una cantidad de papaína eficaz para escindir proteínas distintas de sacrosidasa en dicha suspensión mientras que no se escinde sacrosidasa en dicha suspensión;

(b) acidificar y filtrar la suspensión digerida para eliminar restos celulares para dar un filtrado acidificado;

(c) tratar el filtrado acidificado con uno o más agentes de colorantes para dar una suspensión decolorada;

(d) filtrar y concentrar la suspensión decolorada para dar una solución concentrada de sacrosidasa;

(e) diafiltrar la solución concentrada de sacrosidasa para dar una solución de sacrosidasa hipoalérgena, en donde la estructura primaria de la sacrosidasa es un polipéptido de 513 aminoácidos que está glucosilado, y en donde la solución tiene una actividad sacrosidasa de al menos aproximadamente 22.000 UI/ml en agua a un pH de aproximadamente 4,6 ± 0,1 y que tiene menos de 50 ppb (50 nanogramos/ml) de papaína.

7. La sacrosidasa de la reivindicación 6, en donde la etapa (d) comprende filtración Sparkler seguida de ultrafiltración.

8. La sacrosidasa de la reivindicación 6 o 7, en donde el agente decolorante comprende carbón activado.

9. La sacrosidasa según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la diafiltración se lleva a cabo frente a cuatro o más volúmenes de amortiguador citrato.

10. La sacrosidasa según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además añadir aproximadamente 45-54% en peso de glicerol a la solución acuosa de sacrosidasa.

FIGURA 1

Diagrama de flujo del proceso de fabricación

Etapa / Equipo	Materiales	Control del proceso	Resultados
1. Digestión de levadura en (reactor de 1.000 gal.)	> agua desionizada (filtrada) > levadura > hidróxido sódico, solución 25% > papaína (100 TU/mg) > peróxido de hidrógeno	30° - 34°C pH = 7 ± 0,1 Durante 17,5 a 22 horas	Mezcla con restos celulares y proteínas disueltas
2. Acidificación en producto digerido	> ácido fosfórico, 85% > tierra de diatomeas	22° - 26°C pH = 4,0 ± 0,1	Mezcla con restos celulares y proteínas disueltas. Papaína inactivada
3. Eliminación de restos celulares (Filtro Sparkler)	> agua desionizada (filtrada) > papel de filtro	20° - 25°C	Solución proteica
4. Decolorización del filtrado	> carbón activado > solución de peróxido de hidrógeno > sulfato de alúmina > tierra de diatomeas > papel de filtro	23° - 27°C Durante 30-60 minutos	Mezcla con carbón, flóculos de hidróxido de aluminio y proteínas disueltas
5. Eliminación de sólidos (Filtro Sparkler)		No más de una cantidad mínima de carbón restante en el líquido. Filtro en línea a través de un filtro de 0,2 micras	Solución de proteína clarificada
6. Concentración por ultrafiltración (Equipo de Ultrafiltración)	> Membrana del filtro de polietersulfona límite de P.M. 40 kDa	22°-28°C; reducción de volumen suficiente para ajustar el lote en equipo de UF	Solución de sacrosidasa concentrada (~250 l)
7. Diafiltración seguida de concentración (Equipo de Ultrafiltración)	> agua desionizada (filtrada) > citrato sódico > ácido cítrico > hidróxido sódico, 25%	pH = 4,6 ± 0,1 Actividad de sacarasa destinataria de ≥ 22.000 UI/ml	Solución de sacrosidasa ultrapura, concentrada. Concentración de papaína sustancialmente reducida
8. Ajuste de pH (1000 l p. tot./bomba recirculación)	> ácido fosfórico, 85% o > hidróxido sódico, 25%	pH = 4,3 ± 0,1	Sacrosidasa concentrada con pH óptimo
9. Mezcla con glicerina	> glicerina	Valor del análisis de sacarasa destinataria de > 10.000 UI/ml y contenido en glicerina de 45 a 54% en peso	Solución de sacrosidasa concentrada que contiene glicerina
10. Filtración en tambores de HDPE	> Filtro en línea a través de dos filtros de 0,2 micras en serie		Solución de sacrosidasa concentrada y filtrada que contiene glicerina

FIGURA 2

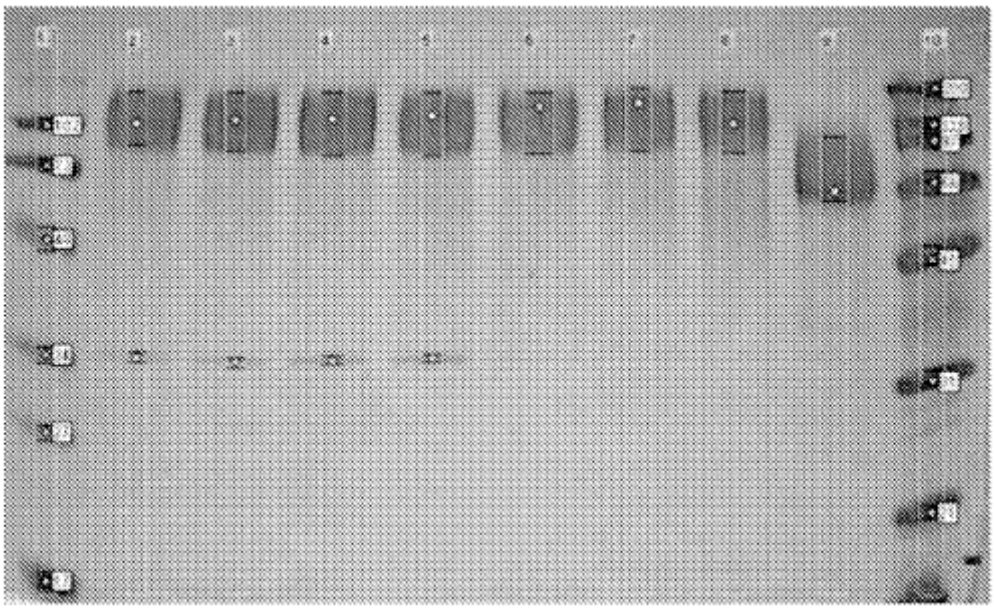


FIGURA 3

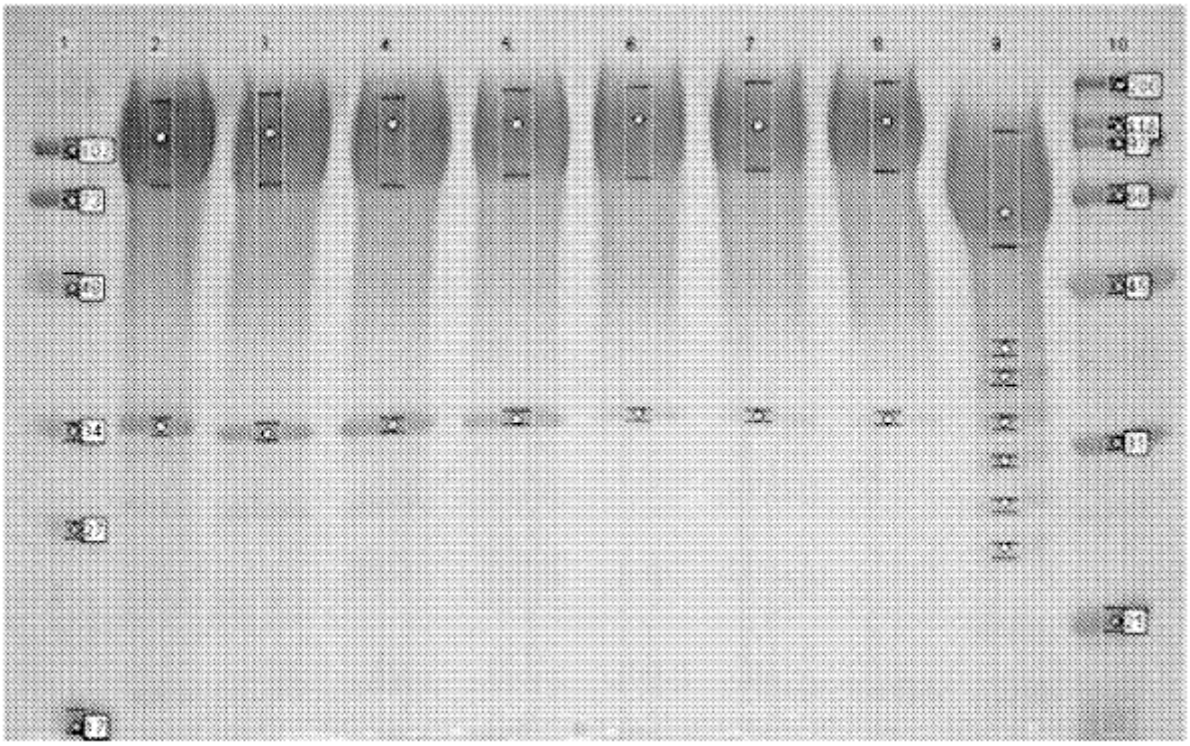


FIGURA 4

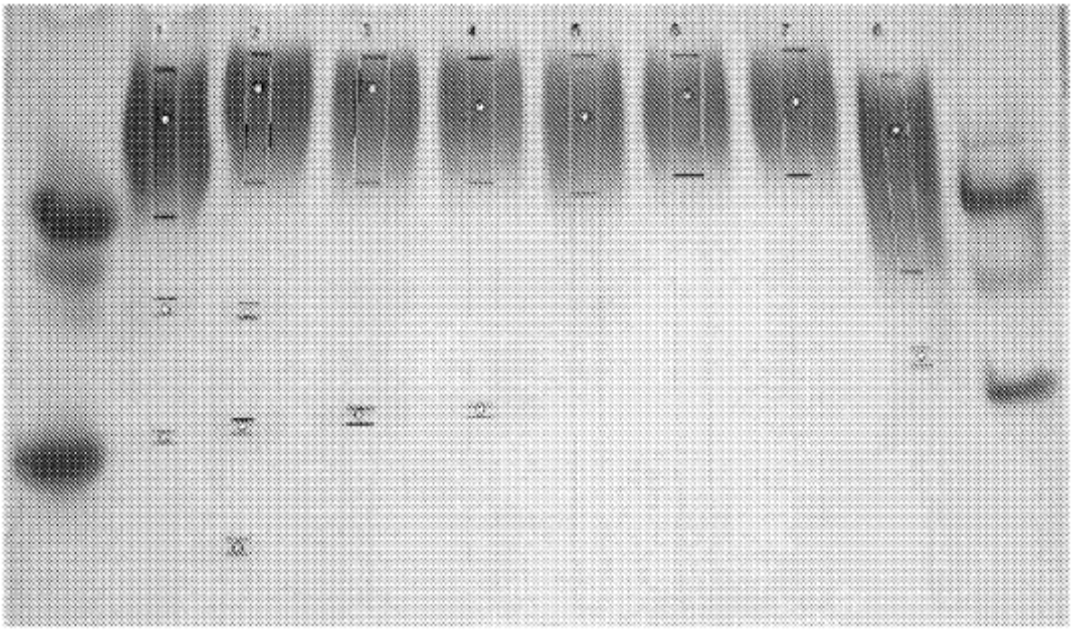
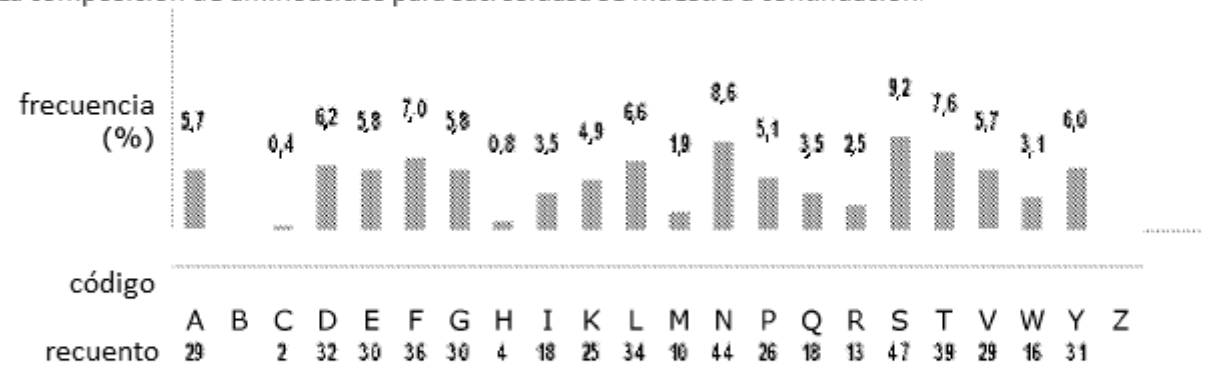


FIGURA 5

```
  1 SMTNETSDRP LVHFTPNKGW MNDPNGLWYD EKDAKWHLYF QYNPNDTVWG
 51 TPLFWGHATS DDLTNWEDQP IAIAPKRNDS GAFSGSMVVD YNNTSGFFND
101 TIDPRQRCVA IWTYNTPESE EQYISYSLDG GYTFTEYQKN PVLAANSTQF
151 RDPKVFWYEP SQKWIMTAAK SQDYKIEIYS SDDLKSWKLE SAFANEGFLG
201 YQYECPGLIE VPTEQDPSKS YWVMFISINP GAPAGGSFNQ YFVGSFNGTH
251 FEAFDNQSRV VDFGKDYYAL QTFFNTDPTY GSALGIAWAS NWEYSAFVPT
301 NPWRSSMSLV RKFSLNTEYQ ANPETELINL KAEPILNISN AGPWSRFATN
351 TTLTKANSYN VDLSNSTGTL EFELVYAVNT TQTISKSVFA DLSLWFKGLE
401 DPEEYLRMGF EVSASSFFLD RGNSKVKFVK ENPYFTNRMS VNNQPFKSEN
451 DLSYYKVYGL LDQNILELYF NDGDVVSTNT YFMTTGNALG SVNMTTGVDN
501 LFYIDKFQVR EVK
```

La composición de aminoácidos para sacrosidasa se muestra a continuación:



Número de restos = 513

Peso molecular = 58631,39

A	Ala	89,09	G	Gly	75,07	N	Asn	132,12	V	Val	117,15
B	Asx	132,61	H	His	155,16	P	Pro	115,13	W	Trp	204,23
C	Cys	121,15	I	Ile	131,17	Q	Gln	146,15	Y	Tyr	181,19
D	Asp	133,10	K	Lys	146,19	R	Arg	174,20	Z	Glx	146,64
E	Glu	147,13	L	Leu	131,17	S	Ser	105,09			
F	Phe	165,19	M	Met	149,21	T	Thr	119,12	X	mean	128,16

La fórmula moleclar para Sacrosidasa, basada en la composición de aminoácidos, es $C_{2662}H_{4909}N_{663}O_{1329}S_{12}$.