

DESCRIPCIÓN

FORMULACIÓN LIOFILIZADA QUE COMPRENDE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE INCLUYE A-GALACTOSIDASA A

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una formulación liofilizada que incluye una proteína de fusión de la α -galactosidasa A y un método de preparación de la misma, y un uso de la misma.

Técnica anterior

- 10 Los lisosomas son orgánulos intracelulares implicados en la degradación de proteínas, diversos lípidos como los glicolípidos y el colesterol, y carbohidratos y en el reciclaje de productos degradados como constituyentes primarios de nuevas proteínas, componentes de membrana y otras moléculas. Las enfermedades asociadas con sus funciones incluyen las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD).

- 15 Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) son enfermedades que resultan de defectos en los genes que codifican enzimas presentes en los lisosomas y que degradan los productos de desecho de glicolípidos o polisacáridos, y la actividad biológica de las enzimas lisosomales se reduce significativamente o está ausente en las células y tejidos de las
- 20 personas con enfermedades de almacenamiento lisosomal. Dicha deficiencia de enzimas degradativas provoca la acumulación de sustancias en grandes cantidades, lo que provoca un problema en la función de las células.

La enfermedad de Fabry, conocida como enfermedad de almacenamiento lisosomal, es un trastorno hereditario del metabolismo de los glicolípidos (glicoesfingolípidos) que resulta de una actividad deficiente o insuficiente de la alfa-galactosidasa A, que es una hidrolasa presente en los lisosomas. La enfermedad de Fabry, como enfermedad representativa de la deficiencia de α -galactosidasa A, es una enfermedad asociada con el cromosoma X, y los pacientes típicos de Fabry generalmente tienen una actividad de α -galactosidasa A de menos del 1 % en comparación con la de las personas normales y tienen una amplia gama de síntomas que incluyen dolor intenso en las extremidades (acroparestesia), hipohidrosis, cambios en la córnea y lenticulares, lesiones cutáneas (angioqueratoma), insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular, insuficiencia pulmonar, síntomas del sistema nervioso y accidente cerebrovascular.

La enfermedad de Fabry causa la acumulación progresiva de globotriaosilceramida (Gb3) en la mayoría de los tejidos del cuerpo. La acumulación de Gb3 se encuentra principalmente en el endotelio vascular. Esta acumulación progresiva de Gb3 en el endotelio vascular conduce a la isquemia y al infarto en órganos como los riñones, el corazón o el cerebro.

Se han llevado a cabo varios estudios sobre la terapia de reemplazo enzimático (ERT) como un método representativo para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento lisosomal (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 26 de noviembre de 2012; 199(5):723-34). En particular, dado que las

enfermedades de almacenamiento lisosomal son causadas por defectos genéticos en enzimas particulares, es esencial una terapia que reemplace la enzima deficiente. La terapia de reemplazo enzimático es una terapia estándar en las enfermedades de almacenamiento lisosomal y puede tener un efecto en el alivio de los síntomas existentes o retrasar el progreso de la enfermedad al reemplazar la enzima deficiente. De acuerdo con lo anterior, se han realizado estudios sobre varias formulaciones, incluida la α -galactosidasa A, para prevenir y tratar la deficiencia de α -galactosidasa A.

Sin embargo, en el caso de las formulaciones, la composición de una formulación para obtener estabilidad varía significativamente de acuerdo con la estructura, las propiedades fisicoquímicas, la dosis, etcétera, de un ingrediente activo (por ejemplo, fármaco proteico), por lo que es esencial desarrollar una composición particular adecuada para el principio activo, y el desarrollo de una formulación que incluya la α -galactosidasa A es insuficiente. En particular, en el caso de una formulación liofilizada que incluye una proteína de fusión de α -galactosidasa A a una alta concentración, la estabilidad del almacenamiento se deteriora considerablemente debido a un problema como la precipitación de proteínas y, por lo tanto, las formulaciones liofilizadas convencionales incluyen una proteína de fusión de α -galactosidasa A a una concentración de 5 mg/ml o menos. Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar una formulación altamente estable que incluya una proteína de fusión de α -galactosidasa A de alta concentración para aumentar la eficacia.

Divulgación de la invención

Problema técnico

El desarrollo de una formulación liofilizada estable, adecuada para el almacenamiento a largo plazo y que tenga la actividad de la α -galactosidasa A durante mucho tiempo, es insuficiente, y no se ha desarrollado una formulación liofilizada que incluya una proteína de fusión de α -galactosidasa A a una alta concentración, por lo que todavía es necesario desarrollar una formulación liofilizada que incluya una composición novedosa de una proteína de fusión de α -galactosidasa A.

10 Solución al problema

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación liofilizada que incluya una proteína de fusión de la α -galactosidasa A.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar la formulación liofilizada.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para reconstituir la formulación liofilizada.

Efectos ventajosos de la invención

La formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención no sólo tiene estabilidad de almacenamiento al incluir una composición que proporciona estabilidad estructural a una proteína de fusión de la α -galactosidasa A, sino que también tiene una excelente estabilidad aunque la proteína de fusión esté contenida en una alta concentración.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de la comparación de la apariencia de la torta de una formulación liofilizada de acuerdo con la adición de un aminoácido.

La FIG. 2 muestra los resultados de la comparación de la recuperación de la forma nativa de una formulación liofilizada de acuerdo con la adición de un aminoácido.

La FIG. 3 muestra los resultados de la comparación de la apariencia de la torta de una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios en la concentración de aminoácidos.

La FIG. 4 muestra los resultados de la comparación de la formación de agregados solubles en una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios en la concentración de aminoácidos antes y después de la liofilización.

La FIG. 5 muestra los resultados de la comparación de la recuperación de la forma nativa de una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios en la concentración de aminoácidos.

La FIG. 6 es un cromatograma de una formulación liofilizada reconstituida para identificar agregados solubles (HMW1) y agregados de orden superior (HMW2) que se forman en una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios en la concentración de aminoácidos.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona una formulación liofilizada que incluye una proteína de fusión α -galactosidasa A.

En una realización específica, la formulación liofilizada incluye una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A se enlaza a una región de inmunoglobulina Fc; un tampón; y un aminoácido.

- 5 En otra realización específica, la formulación liofilizada se caracteriza por incluir una mezcla preparada mediante liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión a una concentración de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; y un aminoácido a una concentración de 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v).
- 10 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir una mezcla preparada mediante liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; 50 mM a 300 mM de cloruro de sodio; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.
- 15 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir una mezcla preparada mediante liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 1.0 % (p/v) a 4.0 %
- 20 (p/v) de serina.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir una mezcla preparada

mediante liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0 que contenga de 1 mM a 30 mM de histidina; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.

- 5 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir una mezcla preparada mediante liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0 que contenga de 10 mM a 30 mM de histidina; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 10 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; un 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de azúcar o alcohol de azúcar; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.

- La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el tampón incluye histidina o una sal del mismo, ácido cítrico o una sal del mismo, ácido acético o una sal del mismo, ácido fosfórico o una sal del mismo, o cualquier combinación de los 15 mismos.

 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el tampón incluye de 1 mM a 50 mM de histidina.

- 20 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en serina, arginina, treonina, glutamina, glicina, alanina y

cualquier combinación de los mismos.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la solución acuosa incluye además un 0.5 % (p/v) a un 4.0 % (p/v) de azúcar.

- 5 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el azúcar es glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa o cualquier combinación de los mismos.

- 10 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la solución acuosa incluye además un 0.5 % (p/v) a un 4.0 % (p/v) de alcohol de azúcar.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el alcohol de azúcar es manitol, sorbitol o cualquier combinación de los mismos.

- 15 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la solución acuosa incluye además un tensioactivo no iónico de 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v).

- 20 La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en poloxámero 188, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y cualquier combinación de los mismos.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la solución acuosa incluye además un agente isotónico de 5 mM a 300 mM.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el agente isotónico es cloruro de sodio.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el cloruro de sodio está contenido en la solución acuosa a una concentración de 50 mM a 200 mM.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la α -galactosidasa A incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la región de inmunoglobulina Fc incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la proteína de fusión α -galactosidasa A incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la región de inmunoglobulina Fc se deriva de IgG4.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las

realizaciones específicas se caracteriza porque la región de la inmunoglobulina Fc está aglicosilada.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la proteína de fusión tiene una estructura: dos moléculas de α -galactosidasa A están enlazadas a cada monómero de la región de inmunoglobulina Fc en forma dimérica.

La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la formulación liofilizada se utiliza para prevenir o tratar la enfermedad de Fabry.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar la formulación liofilizada.

En una realización específica, el método para preparar la formulación liofilizada se caracteriza por incluir la liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de α -galactosidasa A en la que la α -galactosidasa A se enlaza a una región de inmunoglobulina Fc, un tampón y un aminoácido.

En otra realización específica, el método para preparar la formulación liofilizada se caracteriza por incluir la mezcla adicional de la solución acuosa con un agente isotónico, un azúcar, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para reconstituir la formulación liofilizada, incluyendo la adición de una solución reconstituyente a la formulación liofilizada.

En una realización específica, la solución reconstituyente es agua destilada.

En otra realización específica, una formulación reconstituida preparada por el método incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A a una
5 concentración de 10 mg/ml a 100 mg/ml.

Modo para la invención

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle.

Mientras tanto, cada una de las descripciones y realizaciones divulgadas en este documento pueden aplicarse aquí para describir diferentes descripciones
10 y realizaciones. Es decir, todas las combinaciones de varios factores divulgados en este documento pertenecen al alcance de la presente invención. Además, el alcance de la presente invención no debe limitarse por las descripciones detalladas que se proporcionan a continuación.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de
15 determinar, utilizando únicamente la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a realizaciones específicas de la presente invención. Se pretende que dichos equivalentes estén comprendidos en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

A lo largo de la especificación, no solo se utilizan los códigos
20 convencionales de una y tres letras para los aminoácidos naturales, sino también los códigos de tres letras generalmente permitidos para otros aminoácidos, como Aib (ácido 2-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina) y ácido α -metil-glutámico.

Además, los aminoácidos mencionados en este documento se abrevian de acuerdo con las reglas de nomenclatura de la IUPAC-IUB de la siguiente manera.

- alanina Ala, A arginina Arg, R
- asparagina Asn, N ácido aspártico Asp, D
- 5 cisteína Cys, C, ácido glutámico, Glu, E
- glutamina Gln, Q glicina Gly, G
- histidina His, H isoleucina Ile, I
- leucina Leu, L lisina Lys, K
- metionina Met, M fenilalanina Phe, F
- 10 prolina Pro, P serina Ser, S
- treonina Thr, T, triptófano, Trp, W
- tirosina Tyr, Y valina Val, V

Un aspecto de la presente invención proporciona una formulación liofilizada que incluye una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A se
15 enlaza a una región de inmunoglobulina Fc.

Específicamente, la presente invención se refiere a una formulación liofilizada que incluye una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene una proteína de fusión de la región Fc de α -galactosidasa A-inmunoglobulina en una cantidad farmacológicamente efectiva,
20 un tampón y un aminoácido. Además, la solución acuosa puede incluir además un agente isotónico, un azúcar, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos, sin limitarse a ellos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "formulación liofilizada" se refiere a un medicamento formulado por liofilización. Específicamente, una proteína de fusión de la α -galactosidasa A puede liofilizarse junto con una sustancia utilizada para estabilizar la proteína de fusión, como un excipiente, y estar presente en estado sólido. Un componente contenido en la formulación liofilizada junto con la proteína de fusión de la α -galactosidasa A, que tiene la eficacia farmacológica de la formulación liofilizada, puede mezclarse con el estabilizador. Tal como se utiliza en este documento, el término "estabilizador" se refiere a una sustancia que mantiene de manera estable un componente de una formulación, como un ingrediente activo, durante un cierto período de tiempo.

En la presente invención, la formulación liofilizada es un concepto que incluye una sustancia liofilizada. La formulación liofilizada se prepara al congelar una preformulación que incluye una formulación preliofilizada que incluye un estabilizador para estabilizar la proteína de fusión α -galactosidasa A y la proteína de fusión α -galactosidasa A, y secar la resultante. En la presente invención, la formulación liofilizada de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede incluir una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión α -galactosidasa A, y la cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede estar contenida en un recipiente de un solo uso o en un recipiente de uso múltiple, sin limitarse a ello. La formulación liofilizada de la presente invención tiene una composición capaz de estabilizar la proteína de fusión de la α -galactosidasa A durante el proceso de liofilización, e incluso

mientras se reconstituye la formulación liofilizada almacenada, se puede mantener la estabilidad de la formulación. Particularmente, la formulación liofilizada de la presente invención tiene un efecto en el mantenimiento de la estabilidad incluso cuando la proteína de fusión de la α -galactosidasa A está
5 contenida en ella a una alta concentración de 5 mg/ml a 50 mg/ml.

Además, la formulación liofilizada que incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con la presente invención en un estado de almacenamiento en un contenedor puede reconstituirse para su administración a un individuo.

10 Tal como se utiliza en este documento, el término "reconstitución" se refiere a un proceso de licuación de la sustancia liofilizada en un estado sólido tal que la proteína de fusión α -galactosidasa A puede administrarse. En este caso, la concentración de la proteína de fusión α -galactosidasa A contenida en la formulación liofilizada de la presente invención puede ser de 1 mg/ml a
15 150 mg/ml, de 10 mg/ml a 120 mg/ml, o de 10 mg/ml a 100 mg/ml cuando la formulación liofilizada está reconstituída, sin limitarse a ello. La concentración de la preformulación durante un proceso de liofilización puede ser diferente de la que se produce después de la reconstitución.

La formulación liofilizada de la presente invención se caracteriza por incluir
20 un estabilizador capaz de estabilizar la estructura de la proteína de fusión de tal manera que la eficacia farmacológica de la proteína de fusión α -galactosidasa A se retiene durante mucho tiempo durante el almacenamiento a largo plazo. La

formulación liofilizada de la presente invención se caracteriza por incluir una mezcla preparada mediante liofilización de la solución acuosa que incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A, el tampón y el aminoácido.

La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención tiene una
5 estructura en la que la α -galactosidasa A se fusiona con una región de inmunoglobulina Fc. Un fenómeno en desarrollo, en el que la estructura de la proteína se deforma por varios factores externos (por ejemplo, pH, temperatura, ósmosis y presencia de estabilizador), ocurre durante un proceso de liofilización, reconstitución o almacenamiento, y causa pérdida de actividad enzimática que
10 resulta en una disminución significativa en la eficacia farmacológica de la formulación, incluida la α -galactosidasa. En particular, uno de los dos dominios que constituyen la α -galactosidasa A se desdobla primero (para formar agregados solubles) y el otro dominio de la α -galactosidasa A y la región de inmunoglobulina Fc se despliegan secuencialmente, seguidos de la formación
15 de agregados de orden superior y, finalmente, los dominios CH2 y CH3 de la región de inmunoglobulina Fc se despliegan (para formar agregados insolubles). En este caso, se forman precipitados reconocibles por observación visual. Cuando la estructura de la proteína de fusión de la α -galactosidasa A no se mantiene debido a un estrés generado durante el almacenamiento de la
20 formulación liofilizada, se forman agregados solubles o agregados de orden superior y aumenta el riesgo de inmunogenicidad, lo que provoca un problema de seguridad.

Los inventores actuales han descubierto no sólo que la inclusión de una composición que inhiba el despliegue de la proteína de fusión de la α -galactosidasa A es importante para la estabilidad de la formulación liofilizada, sino también que la actividad enzimática de la α -galactosidasa A se mantiene, ya que la estructura de un sitio activo se mantiene hasta que se forman agregados insolubles, incluso después de que la α -galactosidasa A se despliega parcialmente y se forman agregados solubles a partir de ella e identificó que es importante agregar un estabilizador (por ejemplo, aminoácido) para mantener la estabilidad estructural de la proteína de fusión de la α -galactosidasa A tanto como sea posible y, además, para prevenir la formación de agregados insolubles causados a medida que avanza el fenómeno de despliegue de los agregados solubles, completando así la presente invención. La formulación liofilizada de la presente invención puede mantener la estructura y actividad de la proteína de fusión incluso después de un almacenamiento a largo plazo y tener una alta seguridad de medicación debido a su baja inmunogenicidad.

En un ejemplo específico, la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede incluir una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye: una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A se fusiona con una región de inmunoglobulina Fc; un tampón; y un aminoácido, más específicamente, que incluye: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; y un aminoácido a una concentración de 0.25 % (p/v) a 4.0 % (p/v).

Además, en otro ejemplo, la formulación liofilizada puede incluir: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; y un aminoácido a una concentración de 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v), en el que el pH es de 5.5 a 7.0.

- 5 Además, en otro ejemplo, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.

- En otro ejemplo, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla
10 preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.

- En otro ejemplo, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla
15 preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0 que contenga de 1 mM a 30 mM de histidina; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina.

- 20 En otro ejemplo, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye: una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0 que

contenga de 1 mM a 30 mM de histidina; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; un 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de azúcar o alcohol de azúcar; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina, pero la formulación liofilizada de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "solución acuosa" se refiere a una sustancia que incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A y que ayuda al almacenamiento estable de la proteína de fusión α -galactosidasa A y mantiene la estabilidad durante un proceso de liofilización y en el caso de reconstitución. En particular, la solución acuosa incluye un excipiente que

10 estabiliza la proteína de fusión de la α -galactosidasa A, proporciona estabilidad a la proteína de fusión de la α -galactosidasa A durante el proceso de liofilización y permite la preparación de una formulación liofilizada con estabilidad de almacenamiento. El estabilizador puede incluir un tampón y un aminoácido. Aunque no se limita a ello, el estabilizador puede incluir además un agente

15 isotónico, un azúcar, un alcohol de azúcar, un tensioactivo no iónico, un conservante y similares. En proteínas como la proteína de fusión α -galactosidasa A, la estabilidad del almacenamiento es importante no solo para una dosificación precisa, sino también para inhibir la producción potencial de una sustancia antigénica para la proteína de fusión α -galactosidasa A. La solución acuosa

20 puede utilizarse indistintamente con la "preformulación" en la presente invención.

Debido a que la concentración de la proteína de fusión de la α -galactosidasa A puede controlarse ajustando un volumen de una solución

reconstituyente añadida a la formulación liofilizada, la concentración de la proteína de fusión de la α -galactosidasa A en la solución acuosa no es particularmente limitada, pero la solución acuosa puede liofilizarse de manera estable incluso cuando la proteína de fusión de la α -galactosidasa A está
5 contenida en una alta concentración de aproximadamente 10 mg/ml o más específicamente aproximadamente 10 mg/ml a 90 mg/ml, y la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede mantenerse en una solución reconstituida.

Por ejemplo, la solución acuosa de la presente invención puede incluir la
10 proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a 90 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 70 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 50 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 50 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 90 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a 50 mg/ml, o aproximadamente 10 mg/ml a 30 mg/ml, sin limitarse a ello.

15 Tal como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" se refiere a un rango que incluye todos los ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 , ± 0.01 o similares, e incluye todos los valores numéricos equivalentes a los que vienen inmediatamente después del término "acerca de" o aquellos en un rango similar, sin limitarse a ellos.

20 Es generalmente sabido que a medida que aumenta la concentración de una proteína contenida en una formulación, se producen problemas como una disminución de la estabilidad de la formulación y un aumento de los precipitados.

Sin embargo, en el caso de que la solución acuosa, incluida la composición estabilizadora de acuerdo con la presente invención, esté liofilizada, la estructura de la proteína de fusión durante un proceso de liofilización y un proceso de reconstitución sin causar precipitados aunque la proteína de fusión esté
5 contenida a una alta concentración y, por lo tanto, la solución acuosa puede contener la proteína de fusión α -galactosidasa A, como ingrediente activo en una alta concentración, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml o más, aproximadamente 15 mg/ml o más, aproximadamente 35 mg/ml o más, aproximadamente 50 mg/ml o más, o aproximadamente
10 90 mg/ml o más.

El tampón, como componente contenido en la solución acuosa de la presente invención, es una solución que cumple una función en el mantenimiento del pH de la solución acuosa para evitar cambios rápidos en el pH de una formulación durante el proceso de liofilización o después de la reconstitución. La
15 solución acuosa de la presente invención puede utilizarse como disolvente de la proteína de fusión α -galactosidasa A y el estabilizador, y cualquier solución acuosa puede utilizarse como tampón de la presente invención sin limitación siempre que se establezca el nivel de pH en el que se estabiliza la proteína de fusión α -galactosidasa A.

20 El valor del pH afecta la estructura de la proteína de fusión, y la estructura de la proteína de fusión puede mantenerse de manera estable a un pH de 5.5 a 7.0. Cuando el pH está fuera de un rango de pH apropiado, la α -galactosidasa A

se despliega antes que la región de inmunoglobulina Fc, lo que resulta en un deterioro de la estabilidad estructural. Por lo tanto, es importante obtener la estabilidad estructural de la proteína de fusión α -galactosidasa A manteniendo el pH en un nivel adecuado.

5 El tampón puede incluir ácido fosfórico y una sal alcalina del mismo, como sal conjugada (por ejemplo, fosfato: fosfato de sodio, fosfato de potasio o sal de hidrógeno o dihidrógeno), ácido cítrico y una sal de este (por ejemplo, citrato de sodio), ácido acético y una sal del mismo (por ejemplo, acetato de sodio), o histidina y una sal de la misma, y cualquier mezcla de la misma, puede usarse
10 como tampón, sin limitarse a ello. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse a partir de un tampón de ácido cítrico (por ejemplo, tampón de citrato de sodio), un tampón de ácido acético (por ejemplo, tampón de acetato de sodio), un tampón de ácido fosfórico (por ejemplo, tampón fosfato sódico), un tampón de histidina y cualquier combinación de los mismos, y el tampón o una sustancia utilizada
15 como tampón en la solución acuosa (ácido cítrico y una sal del mismo, ácido acético y una sal del mismo, histidina y una sal del mismo, ácido fosfórico y una sal del mismo, o cualquier combinación de los mismos) pueden estar contenidos en una concentración suficiente para mantener el pH de la estabilidad estructural de las proteínas.

20 El pH de la solución acuosa puede ser de 5.0 a 8.0, por ejemplo, de 5.0 a 7.5, de 5.0 a 7.0, de 5.0 a 6.5, de 5.0 a 6.0, de 5.5 a 8.0, de 5.5 a 7.5, de 5.5 a 7.0, de 5.5 a 7.0, de 5.5 a 6.5, de 5.5 a 6.3, de 5.5 a 6.2, de 5.5 a 6.1, de 5.5 a

6.0, de 5.5 a 5.9, de 5.5 a 5.8, de 5.5 a 5.7, de 5.5 a 5.7, de 5.5 a 5.6, de 6.0 a 6.5, o de 6.5 a 7.0, o de 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 o 7.0, pero no se limita particularmente a ellos.

Para obtener el pH objetivo, el tampón puede incluir ácido fosfórico, ácido
5 cítrico, ácido acético, histidina o sales o mezclas de los mismos a una
concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM,
aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 5 mM
a aproximadamente 80 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente
40 mM, aproximadamente 8 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente
10 8 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente
30 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM,
aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 10 mM
a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 15 mM a aproximadamente
25 mM, o aproximadamente 20 mM, sin limitarse a ellos.

15 En una realización específica, el tampón puede incluir unos 20 mM de
histidina y tener un pH de aproximadamente 5.5 a 7.0 o de aproximadamente 5.5
a 6.5, sin estar limitado a ello.

El aminoácido contenido en la solución acuosa de la presente invención
impide el despliegue de la α -galactosidasa A proteína de fusión contenida en la
20 solución acuosa para inhibir la formación de agregados insolubles. Una vez que
se forman agregados insolubles a medida que la deformación estructural
(despliegue) procede aún más de los agregados solubles, se producen

problemas como la precipitación de proteínas y la pérdida de actividad enzimática.

En el Ejemplo Experimental de la presente invención, se confirmó que una formulación liofilizada que incluía un aminoácido (serina) tenía una apariencia
5 apropiada y una alta recuperación de la forma nativa, en comparación con una preformulación que no incluía el aminoácido. Además, se confirmó que a medida que aumentaba la concentración del aminoácido, específicamente, cuando una formulación liofilizada de una solución acuosa incluye un aminoácido en una cantidad de 0.5 % (p/v) o más basada en un volumen total de la solución acuosa,
10 se obtenía una apariencia más adecuada y el despliegue de la proteína de fusión α -galactosidasa A era más inhibido, inhibiendo así la formación de agregados solubles y agregados de orden superior. Además, la recuperación de la forma nativa aumentaba a medida que aumentaba la concentración del aminoácido. Debido a que la formación de los agregados solubles o agregados de orden
15 superior puede causar inmunogenicidad cuando se administra una formulación al cuerpo, se requiere inhibir la formación de los agregados solubles o agregados de orden superior.

El aminoácido contenido en la formulación liofilizada de la presente invención puede ser serina, arginina, lisina, treonina, asparagina, glutamina,
20 glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, o cualquier combinación de los mismos, específicamente, puede seleccionarse del grupo que consta de serina, arginina, treonina, glutamina, glicina, alanina, y cualquier

combinación de los mismos, sin limitarse a ellos. Como ejemplo específico, el aminoácido puede ser serina, sin limitarse a ella.

Basado en el volumen total de la solución acuosa de la presente invención, el aminoácido puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1 % (p/v) a 5.0 % (p/v), aproximadamente 0.25 % (p/v) a 5.0 % (p/v), aproximadamente 0.25 % (p/v) a 4.0 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 5.0 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v), aproximadamente 1.0 % (p/v) a 5.0 % (p/v), aproximadamente 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v), aproximadamente 2.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v), aproximadamente 2.0 % (p/v) a 5.0 % (p/v), aproximadamente 2.5 % (p/v) a 5 % (p/v), aproximadamente 3.0 % (p/v) a 5 % (p/v), aproximadamente 2.0 % (p/v) a 4.5 % (p/v), aproximadamente 2.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v), o aproximadamente 0.25 % (p/v), 0.5 % (p/v), aproximadamente 1.0 % (p/v), aproximadamente 2.0 % (p/v), aproximadamente 3.0 % (p/v), aproximadamente 4.0 % (p/v) o aproximadamente 5.0 % (p/v), sin limitarse a ello.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además un tensioactivo no iónico. El tensioactivo no iónico se refiere a una sustancia que reduce la tensión superficial de una solución de proteína para evitar que la proteína se adsorba o se agregue en una superficie hidrofóbica después de la reconstitución.

Ejemplos del tensioactivo no iónico disponible en la presente invención pueden ser un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 (monolaurato de sorbitán de polioxietileno (20)), polisorbato 40 (monopalmitato de sorbitán de

polioxietileno (20)), polisorbato 60 (monoestearato sorbitán de polioxietileno (20)), polisorbato 80 (monooleato de sorbitán de polioxietileno (20)); en el que el número 20 que sigue al polioxietileno indica un número total de grupos oxietileno $-(CH_2CH_2O)-$), poloxámero (copolímero PEO-PPO-PEO; en el que PEO: poli(óxido de etileno) y PPO: poli(óxido de propileno)), polietileno-polipropilenglicol, un compuesto de polioxietileno (por ejemplo, estearato de polioxietileno, éter de alquilo de polioxietileno (alquilo: C1-C30), éter monoalílico de polioxietileno, copolímero de polioxietileno de alquilfenilo (alquilo: C1-C30), y similares), y sulfato de dodecilo de sodio (SDS), o puede ser polisorbato o poloxámero, utilizados solos o en una combinación de al menos dos de ellos.

Específicamente, el tensioactivo no iónico puede ser poloxámero 188, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80, que pueden utilizarse en combinación, sin limitarse a ellos.

En la presente invención, el surfactante no iónico puede estar contenido en la solución acuosa de la presente invención a una concentración de aproximadamente 0.2 % (p/v) o menos, por ejemplo, aproximadamente 0.001 % (p/v) a aproximadamente 0.2 % (p/v), aproximadamente 0.001 % (p/v) a aproximadamente 0.1 % (p/v), aproximadamente 0.002 % (p/v) a aproximadamente 0.1 % (p/v), aproximadamente 0.01 % (p/v) a aproximadamente 0.1 % (p/v), aproximadamente 0.01 % (p/v) a aproximadamente 0.05 % (p/v), aproximadamente 0.02 % (p/v) a aproximadamente 0.05 % (p/v), aproximadamente 0.025 % (p/v) a

aproximadamente 0.05 % (p/v), o aproximadamente 0.025 % (p/v), de acuerdo con el volumen total de la solución acuosa, sin limitarse a ello.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además un agente isotónico. El agente isotónico se refiere a una sustancia que
5 sirve para ajustar adecuadamente una presión osmótica en el caso de la administración al cuerpo después de la reconstitución de la proteína de fusión α -galactosidasa A. Además, el agente isotónico puede tener un efecto adicional en la estabilización adicional de la proteína de fusión α -galactosidasa A en la solución acuosa. Cualquier agente isotónico puede estar contenido en la solución
10 acuosa de la presente invención sin limitación siempre que el agente isotónico contribuya a la estabilización de la proteína de fusión α -galactosidasa A.

El agente isotónico puede incluir una sal inorgánica soluble en agua, en concreto, la solución acuosa de la presente invención puede incluir cloruro de sodio como agente isotónico, sin limitarse a ello.

15 La concentración de cloruro de sodio utilizada en la presente invención puede ser de aproximadamente 0 mM a 300 mM, específicamente, aproximadamente 0,1 mM a 300 mM, aproximadamente 5 mM a 300 mM, aproximadamente 5 mM a 200 mM, aproximadamente 5 mM a 150 mM, aproximadamente 5 mM a 100 mM, aproximadamente 10 mM a 200 mM,
20 aproximadamente 10 mM a 150 mM, aproximadamente 10 mM a 100 mM, aproximadamente 30 mM a 200 mM, aproximadamente 30 mM a 150 mM, aproximadamente 30 mM a 100 mM, aproximadamente 50 mM a 200 mM,

aproximadamente 50 mM a 150 mM, o aproximadamente 50 mM a 100 mM, pero no se limita a ellos, y pueden ajustarse adecuadamente de manera que las preformulaciones, incluidas todas las mezclas, deben ser isotónicas de acuerdo con los tipos y cantidades de componentes contenidos en la solución acuosa.

5 La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además un azúcar. El azúcar se refiere a un monosacárido, disacárido, polisacárido y oligosacárido y puede aumentar la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A en la solución acuosa. Ejemplos de los mismos pueden incluir manosa, glucosa, fructosa, galactosa, fucosa, lactosa, maltosa, sacarosa,
10 trehalosa, rafinosa, dextrano, o cualquier combinación de los mismos, y en una realización específica, el azúcar puede ser glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, o cualquier combinación de los mismos, sin limitarse a ellos. Por ejemplo, el azúcar puede ser sacarosa, pero no se limita particularmente a ella.

15 La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además un alcohol de azúcar, y el alcohol de azúcar se refiere a una sustancia que incluye múltiples grupos hidroxilo e incluye una sustancia en la que los grupos aldehído y/o grupos cetonas de azúcar se sustituyen por grupos alcohol y un azúcar que contiene múltiples grupos hidroxilo. El azúcar o el alcohol de
20 azúcar pueden aumentar la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A. Por ejemplo, el alcohol de azúcar puede incluir al menos uno seleccionado del grupo formado por manitol y sorbitol, sin limitarse a ellos.

El alcohol de azúcar, el azúcar o cualquier combinación de los mismos puede estar presente en la solución acuosa en una cantidad de aproximadamente 0.5 % (p/v) a 20 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 15 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 10 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 8 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 5 % (p/v), aproximadamente 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 10 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 8 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 6 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 4 % (p/v), o aproximadamente 0.0 % (p/v), aproximadamente 1.0 % (p/v), aproximadamente 3.0 % (p/v), aproximadamente 4.0 % (p/v), aproximadamente 5.0 % (p/v), o aproximadamente 8.0 % (p/v) en función de toda la solución acuosa, sin limitarse a ella.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir diferentes tipos de estabilizadores en combinación ajustando las cantidades de los mismos. Por ejemplo, la solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir (i) un aminoácido sin contener azúcar y/o alcohol de azúcar, o (ii) un aminoácido junto con un azúcar y/o alcohol de azúcar, sin limitarse a ello. Aunque no limitado a ello, en la solución acuosa que incluye (i) un aminoácido sin contener azúcar y/o alcohol de azúcar, el contenido del aminoácido puede ser de aproximadamente 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v), y en la solución acuosa que incluye (ii) un aminoácido junto con un azúcar y/o alcohol de azúcar. El contenido de azúcar y/o alcohol de azúcar puede ser de aproximadamente 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v), y el contenido del aminoácido puede

ser de aproximadamente 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v).

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede incluir además un conservante. El conservante, como sustancia que reduce sustancialmente la acción de bacterias y hongos en una formulación, se agrega a la formulación para facilitar la producción de la formulación para administración múltiple. Ejemplos de un posible conservante pueden incluir cloruro de octadecildimetil-bencilo amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruro de alquilbencildimetilamonio en la que un grupo alquilo es un compuesto de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes pueden ser el alcohol aromático como el fenol, el butílico o el alcohol bencílico; alquilparabenos como el metilo o el propilparabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol o m-cresol, sin limitarse a ellos. La concentración del conservante puede ser de 0.001 % (p/v) a 1.0 % (p/v), sin limitarse a ello.

Mientras tanto, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de la presente invención puede incluir opcionalmente otros componentes o sustancias conocidas en la técnica además del tampón, agente isotónico, aminoácido, tensioactivo no iónico, alcohol de azúcar, azúcar y conservante antes descritos dentro de un rango que no perjudique el efecto de la presente invención, sin limitarse a ello.

Como ejemplo específico, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede

ser una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina, sin limitarse a ello.

5 Como otro ejemplo específico, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; un tensioactivo no iónico de 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v); y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina, sin limitarse a ello.

10 Como otro ejemplo específico, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0 que contenga de 10 mM a 30 mM de histidina; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato; y 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina, sin limitarse a ello.

15 Como otro ejemplo específico, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; un tampón con un pH de 5.5 a 7.0; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; y 1.0 % (p/v) a 4.0 % (p/v)
20 de serina, sin limitarse a ello.

Como otro ejemplo específico, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede

ser una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de 5 mg/ml a 50 mg/ml; histidina de 10 mM a 30 mM; 0.002 % (p/v) a 0.1 % (p/v) de polisorbato 20; 50 mM a 200 mM de cloruro de sodio; un 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de azúcar o alcohol de azúcar; y 0.5 % (p/v) a 4.0 % (p/v) de serina, sin limitarse a ello.

- 5 Además, la solución acuosa para preparar la formulación liofilizada o la formulación liofilizada puede incluir además un portador farmacéuticamente aceptable, un excipiente y similares, y este portador o excipiente puede no ser de origen natural.

La solución acuosa para preparar la formulación liofilizada de la presente
10 invención puede congelarse y secarse en condiciones adecuadas de congelación y secado bien conocidas en la técnica. El secado puede completarse con un proceso primario o con uno o varios procesos secundarios.

Además, la formulación liofilizada de la presente invención puede prepararse liofilizando una preformulación que incluya una concentración
15 apropiada de la proteína de fusión α -galactosidasa A en consideración a una dosis deseada, y reconstituyendo el resultante para que sea adecuado para su administración a un individuo. Además, la preformulación puede diluirse para aumentar el volumen y liofilizarse, y luego reconstituirse diluyendo con una solución reconstituyente en un volumen menor que el de la formulación liofilizada,
20 sin limitarse a ello. En la presente invención, la formulación liofilizada puede ser una mezcla preparada mediante la liofilización de una solución acuosa que incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A y un estabilizador (por ejemplo,

tampón y aminoácido), y también ser una formulación reconstituida preparada mediante la reconstitución de la formulación liofilizada utilizando una solución reconstituyente, sin limitarse a ella.

Mientras tanto, a continuación, se describirá con más detalle la proteína de fusión α -galactosidasa A contenida en la formulación liofilizada de la presente invención, como ingrediente activo.

La proteína de fusión α -galactosidasa A contenida en la formulación liofilizada de la presente invención se refiere a una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región de inmunoglobulina Fc, y la proteína de fusión puede tener una estructura en la que dos moléculas de α -galactosidasa A se enlazan a la región de inmunoglobulina dimérica Fc a través de un enlazador. Específicamente, dos moléculas de α -galactosidasa A pueden unirse mediante enlaces covalentes a cada monómero de la región de inmunoglobulina Fc en forma dimérica a través de un enlazador. Además, las dos moléculas de α -galactosidasa A pueden formar un dímero a través de un enlace no covalente, pero no se limita a él. La proteína de fusión de la presente invención ha incrementado la estabilidad de la α -galactosidasa A, ya que la región de la inmunoglobulina Fc está fusionada con la α -galactosidasa A y, por lo tanto, la eficacia farmacológica puede mantenerse durante mucho tiempo en el organismo. La formulación liofilizada de la presente invención no pierde la eficacia farmacológica incluso después de un almacenamiento a largo plazo al proporcionar una excelente estabilidad a la proteína de fusión mediante la

liofilización de una preformulación que contiene la proteína de fusión y un estabilizador.

Específicamente, la proteína de fusión de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o puede ser codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, sin limitarse a ello. La proteína de fusión de la presente invención puede estar en una forma en la que dos monómeros, incluyendo la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, forman un dímero, sin limitarse a ellos. Para la proteína de fusión de la presente invención se incorpora como referencia la especificación de WO 2019/009684.

Tal como se utilizan en este documento, los términos "proteína de fusión en la que se fusiona la α -galactosidasa A a una región de inmunoglobulina Fc", "proteína de fusión α -galactosidasa A" y "proteína de fusión" pueden usarse indistintamente.

La proteína de fusión de la presente invención se expresa en un transformante en una forma en la que la α -galactosidasa A se une a la región de inmunoglobulina Fc a través de un enlazador tal que la α -galactosidasa A forma un dímero a través de un enlace no covalente cuando la región de inmunoglobulina Fc forma un dímero.

La α -galactosidasa A (α -Gal A, GLA) de la presente invención, que es una enzima presente en los lisosomas del bazo, el cerebro, el hígado y similares e hidroliza las fracciones de α -galactosil en los extremos de los glicolípidos y las

glicoproteínas, es una glicoproteína homodimérica. En particular, se sabe que la α -galactosidasa A está asociada con la enfermedad de Fabry, que es una enfermedad de almacenamiento lisosomal. La α -galactosidasa A tiene una estructura dimérica que consta de dos dominios (dominio de barril TIM y dominio similar a la inmunoglobulina de hojas β) (Journal of Biological chemistry, Vol. 287, No. 34, 2012; Lieberman et al. Biochemistry, Vol. 48, No. 22, 2009), y debido a que un fenómeno de despliegue ocurre más fácilmente a medida que aumenta el pH, se requiere que el pH de una formulación que contiene α -galactosidasa A se ajuste adecuadamente. En particular, mientras que el sitio activo se mantiene en el estado de agregados solubles formados a medida que se despliega un dominio, la actividad se pierde una vez que se forman agregados insolubles a medida que avanza el despliegue, se requiere que la formulación incluya un estabilizador para mantener la enzima en el estado activo manteniendo el estado agregado soluble. Además, dado que los agregados solubles aumentan el riesgo de inmunogenicidad, existe un alto riesgo de inducir una respuesta inmunitaria cuando los agregados solubles se administran al cuerpo. Por lo tanto, es importante aumentar la seguridad de los medicamentos aumentando la estabilidad de una formulación para evitar la formación de agregados solubles tanto como sea posible durante el almacenamiento de la formulación.

20 En la presente invención, la α -galactosidasa A puede ser una forma nativa o una forma recombinante, específicamente, puede incluir una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, sin limitarse a ella.

Además, la α -galactosidasa A de la presente invención incluye fragmentos de la forma nativa o análogos de la misma en los que uno o varios aminoácidos son alterados por uno seleccionado del grupo que consiste en sustitución, adición, eliminación, modificación y cualquier combinación de los mismos, sin limitación, siempre que tengan una actividad idéntica o equivalente a la de la forma nativa de la enzima.

Además, la α -galactosidasa A puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 %, 70 % u 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y puede obtenerse de microorganismos mediante el uso de un método de ingeniería genética o estar disponible comercialmente sin limitarse a ello.

Tal como se utiliza en este documento, el término "homología" se refiere a un grado de identidad con una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre o una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, y la comparación de homología puede realizarse mediante observación visual o utilizando un programa de comparación disponible comercialmente. Utilizando un programa informático disponible en el mercado, la homología entre dos o más secuencias puede expresarse como un porcentaje (%). La homología (%) puede calcularse entre secuencias adyacentes.

La información genética de las secuencias de la α -galactosidasa A o sus

derivados, así como de las secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, puede estar disponible en bases de datos conocidas, como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención puede prepararse expresando la proteína de fusión en un transformante en una forma en la que la α -galactosidasa A se une a la región de inmunoglobulina Fc a través de un enlazador.

El enlazador es un enlazador de péptidos, y la proteína de fusión de la presente invención puede estar en una forma en la que la α -galactosidasa A se enlaza a la región de inmunoglobulina Fc a través del enlazador peptídico. Un extremo del enlazador puede estar unido a una de las cadenas de la región de inmunoglobulina Fc en forma de dímero, sin limitarse a ello.

El enlazador peptídico puede incluir uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 1000 aminoácidos, e incluyen cualquier enlazador peptídico conocido en la técnica, como el enlazador [GS] x , el enlazador [GGGS] x y el enlazador [GGGGGS] x , en el que x es un número natural de 1 o mayor (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o más), sin limitarse a ellos. Específicamente, el enlazador peptídico de la presente invención puede consistir de 10 a 50 aminoácidos, más específicamente, de 20 a 40 aminoácidos y puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

En vista de los objetos de la presente invención, los sitios de la α -galactosidasa A y la región de inmunoglobulina Fc a los que se une el péptido

enlazador no son particularmente limitados siempre que la actividad de la α -galactosidasa A se retenga después de unirse a la región de inmunoglobulina Fc. Específicamente, los sitios pueden ser ambos extremos de la región de la α -galactosidasa A y de la región de la inmunoglobulina Fc, más específicamente, el terminal C de la α -galactosidasa A y el extremo N de la región de la inmunoglobulina Fc, sin limitarse a ellos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "Terminal N" o "Terminal C" se refiere al extremo amino terminal y al terminal Carboxilo de las proteínas respectivas. Ejemplos de ello incluyen, pero no se limitan a, no solo los últimos residuos de aminoácidos del extremo Terminal N o el extremo Terminal C, sino también los residuos de aminoácidos cerca del extremo Terminal N o el Terminal C, específicamente, hasta el décimo residuo de aminoácidos del último aminoácido.

En la presente invención, los enlazadores peptídicos pueden unirse a cada uno de los monómeros de la región de inmunoglobulina Fc en forma dimérica, y los enlazadores respectivamente unidos a los monómeros de la región de inmunoglobulina Fc del dímero pueden unirse independientemente a la α -galactosidasa A, sin limitarse a ello.

La región de inmunoglobulina Fc, una de las fracciones que constituyen la proteína de fusión enzimática de la presente invención, puede ser un dímero formado por monómeros de la región de inmunoglobulina Fc.

Tal como se utiliza en este documento, el término "región Fc de

inmunoglobulina" se refiere a una región que incluye un dominio constante de cadena pesada 2 (CH2) y/o un dominio constante de cadena pesada 3 (CH3) que excluye los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera de la inmunoglobulina. En vista de los objetos de la presente invención, la región de
5 inmunoglobulina Fc puede incluir una región bisagra modificada, sin limitarse a ella. Específicamente, la región de la inmunoglobulina Fc puede ser aquella en la que uno o más aminoácidos son alterados de la forma nativa de la región de inmunoglobulina Fc por uno seleccionado del grupo que consiste en sustitución, adición, delección, modificación y cualquier combinación de los mismos, sin
10 limitarse a ello.

La región de inmunoglobulina Fc es una sustancia utilizada como portadora en la producción de fármacos. Con el fin de estabilizar una proteína y evitar que la proteína sea eliminada por el riñón, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre las proteínas de fusión
15 utilizando la región de inmunoglobulina Fc. Las inmunoglobulinas son los principales constituyentes de la sangre y hay cinco tipos diferentes, es decir, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El tipo más utilizado para los estudios de proteínas de fusión es el IgG, y se clasifica en cuatro subtipos (IgG1 a IgG4).

La región de inmunoglobulina Fc puede incluir una región de bisagra en el
20 dominio constante de cadena pesada, los monómeros de la región de inmunoglobulina Fc pueden constituir un dímero a través de la región de bisagra, sin limitarse a ella. Además, la región de inmunoglobulina Fc de la presente

invención puede ser una región Fc extendida que incluye una parte o la totalidad de un dominio constante de cadena pesada 1 (CH1) y/o un dominio constante de cadena ligera 1 (CL1) que excluye los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera de la inmunoglobulina, siempre que la región de inmunoglobulina Fc tenga efectos sustancialmente idénticos o mejorados en comparación con la forma nativa. Además, la región de inmunoglobulina Fc puede ser una región de la que se elimina una parte considerablemente larga de la secuencia de aminoácidos correspondiente al CH2 y/o CH3.

Específicamente, la región de inmunoglobulina Fc de la presente invención puede incluir 1) un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4, 2) un dominio CH1 y un dominio CH2, 3) un dominio CH1 y un dominio CH3, 4) un dominio CH2 y un dominio CH3, o 5) una combinación de uno o más dominios seleccionados de un dominio CH1, un dominio CH2, un dominio CH3 y un dominio CH4 y una región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra), pero no se limita a ellos. Más específicamente, la región de inmunoglobulina Fc puede incluir una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, pero no se limita a ellos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "secuencia de bisagra" se refiere a un sitio ubicado en una cadena pesada y que forma el dímero de la región de inmunoglobulina Fc a través de un enlace inter disulfato. En la presente invención, el dímero está formado por dos moléculas de la cadena de inmunoglobulina Fc a través de la secuencia bisagra de la región de

inmunoglobulina Fc.

Específicamente, la región de la bisagra puede ser una en la que una parte de la región de la bisagra se elimina para tener solo un residuo de cisteína (Cys), o una en la que un residuo de serina (Ser) involucrado en el intercambio en
5 cadena se sustituye por un residuo de prolina (Pro). Más concretamente, la región de la bisagra puede ser aquella en la que el 2º residuo de serina se sustituye por un residuo de prolina, sin limitarse a ello. La región de inmunoglobulina Fc de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, sin limitarse a ella.

10 La región de inmunoglobulina Fc de la presente invención incluye no sólo una secuencia nativa obtenida de la digestión de la inmunoglobulina por papaína, sino también derivados, productos de sustitución y variantes de los mismos, por ejemplo, secuencias diferentes de la secuencia nativa y obtenidas por modificación de uno o más residuos de aminoácidos por delección, adición,
15 sustitución no conservativa o conservadora, o una combinación de ambas. Los derivados, productos de sustitución y variantes son aquellos que tienen la capacidad de unirse a FcRn.

Por ejemplo, en el caso de IgG Fc, los residuos de aminoácidos que se sabe que son importantes en la unión en las posiciones 214 a 238, 297 a 299,
20 318 a 322 o 327 a 331 pueden utilizarse como un sitio adecuado para la modificación.

Además, se pueden utilizar otros tipos de derivados, incluidos aquellos en

los que se elimina un sitio capaz de formar un enlace disulfuro o se eliminan ciertos residuos de aminoácidos del extremo Terminal N de una forma Fc nativa, y se puede agregar un residuo de metionina al extremo Terminal N de la forma Fc nativa. Además, para eliminar las funciones efectoras, se puede eliminar un sitio de unión al complemento, como un sitio de unión a C1q, y se puede eliminar un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las técnicas de preparación de dichos derivados de secuencia de la región de inmunoglobulina Fc se describen en las Publicaciones Internacionales de Patentes Nos. WO 97/34631 y WO 96/32478.

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, son conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios de residuos de aminoácidos más comunes son los intercambios entre Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly. Si es necesario, la región Fc puede modificarse mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación y amidación.

Los derivados de secuencia de la región de inmunoglobulina Fc descritos anteriormente son derivados que tienen una actividad biológica equivalente a la región de inmunoglobulina Fc de la presente invención y una estabilidad estructural mejorada frente al calor, el pH o similares.

Además, estas regiones de inmunoglobulina Fc pueden obtenerse a partir de formas nativas aisladas de humanos y otros animales, como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células animales transformadas o microorganismos. En este sentido, pueden obtenerse a partir de una inmunoglobulina nativa aislando inmunoglobulinas enteras de humanos o animales vivos y tratándolas con una proteasa. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en las regiones Fab y Fc y la pepsina digiere la inmunoglobulina nativa en fragmentos de pF'c y F(ab)₂. Estos fragmentos pueden ser sometidos a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. En una realización más específica, una región de inmunoglobulina Fc derivada del ser humano es una región de inmunoglobulina Fc recombinante obtenida de un microorganismo.

Además, la región de la inmunoglobulina Fc puede tener glicanos naturales o glicanos aumentados o disminuidos en comparación con el tipo natural, o estar en forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de glicanos de la inmunoglobulina Fc puede lograrse mediante cualquier método comúnmente utilizado en la técnica, como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética que utiliza un microorganismo. En este sentido, la región de inmunoglobulina Fc obtenida mediante la eliminación de glicanos muestra una disminución significativa en la afinidad de unión a un complemento C1q y una disminución o pérdida de la citotoxicidad

dependiente de anticuerpos o citotoxicidad dependiente del complemento, por lo que no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias en los organismos vivos. Sobre la base de esto, una región de inmunoglobulina Fc desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada como portador de fármacos para su propio propósito.

Tal como se utiliza en este documento, el término "desglicosilación" se refiere a una región Fc de la que se elimina el glicano mediante una enzima y el término "aglicosilación" se refiere a una región Fc que no está glicosilada y producida en procariotas, más específicamente, E. coli.

Mientras tanto, la región de inmunoglobulina Fc puede derivarse de humanos o animales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas o conejillos de indias. En una realización más específica, la región de inmunoglobulina Fc puede derivarse de humanos.

Además, la región de inmunoglobulina Fc puede derivarse de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, o de cualquier combinación o híbrido de las mismas. En una realización más específica, la región de inmunoglobulina Fc se deriva de IgG o IgM, que son las proteínas más abundantes en la sangre humana, y en una realización aún más específica, se deriva de IgG conocida por mejorar las vidas medias de las proteínas de unión a ligandos. En una realización aún más específica, la región de inmunoglobulina Fc es una región IgG4 Fc, y en la realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana, sin limitarse a ella. La región de

inmunoglobulina Fc de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero no se limita a ella. Más específicamente, la región de inmunoglobulina Fc puede incluir un monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y la región de inmunoglobulina Fc puede ser un homodímero de los monómeros que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, sin limitarse a ello.

Mientras tanto, tal como se utiliza en este documento, el término "combinación" se refiere a la formación de un enlace entre un polipéptido que codifica una región de inmunoglobulina Fc de cadena simple del mismo origen y un polipéptido de cadena simple de un origen diferente cuando se forma un dímero o un multímero. Es decir, se puede preparar un dímero o multímero utilizando dos o más fragmentos de Fc seleccionados del grupo formado por fragmentos de IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc e IgE Fc.

La región de inmunoglobulina Fc de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede estar en forma dimérica, específicamente, puede tener una estructura en la que dos cadenas polipeptídicas están unidas entre sí a través de un enlace disulfuro. Más específicamente, las dos cadenas pueden estar unidas a través del átomo de nitrógeno de una de las dos cadenas, sin limitarse a ellas. El enlace a través del átomo de nitrógeno puede formarse a través de la aminación reductora de un grupo ϵ -amino de la lisina o un grupo amino Terminal N, sin limitarse a ellos. En una realización específica, la región de inmunoglobulina Fc puede estar unida al enlazador por un átomo de nitrógeno de prolina en el

extremo Terminal N, sin estar limitada a él. Una región Fc de la forma dimérica puede estar unida a dos moléculas de α -galactosidasa A mediante enlaces covalentes a través de dos enlazadores, sin limitarse a ellos.

A menos que se indique lo contrario, las descripciones detalladas sobre la α -galactosidasa A o la proteína de fusión de la presente invención divulgadas en la especificación o las reivindicaciones pueden aplicarse no solo a la α -galactosidasa A o a la proteína de fusión, sino también a una sal de la misma (por ejemplo, sal farmacéuticamente aceptable), o una forma solvato de la misma. Por lo tanto, aunque en la especificación solo se describen la " α -galactosidasa A" o la "proteína de fusión", las descripciones de las mismas también pueden aplicarse a sales particulares de las mismas, solvatos particulares de las mismas y solvatos de las sales particulares. Dichas sales pueden ser, por ejemplo, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los tipos de sales no son particularmente limitados. Sin embargo, las sales pueden estar en una forma segura y eficaz en los mamíferos, sin limitarse a ellas.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que puede utilizarse eficazmente para el uso previsto dentro del ámbito de la decisión farmacológica sin inducir toxicidad excesiva, irritación, respuestas alérgicas y similares.

Tal como se utiliza en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal derivada de un ácido inorgánico, ácido orgánico o base farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de un ácido adecuado pueden

incluir ácido clorhídrico, ácido brómico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido tolueno-p-sulfónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido malónico, ácido naftaleno-2-sulfónico y ácido bencenosulfónico. Ejemplos de la sal derivada de una base adecuada pueden incluir metales alcalinos como el sodio y el potasio, metales alcalinotérreos como el magnesio y el amonio.

Además, tal y como se utiliza en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un complejo de la α -galactosidasa A, proteína de fusión o la sal de la misma de acuerdo con la presente invención y una molécula disolvente.

La proteína de fusión puede ser preparada o producida por cualquier método conocido en la técnica, en concreto, puede obtenerse a partir de células animales en las que se inserta un vector de expresión después de cultivar y purificar las células animales, o puede sintetizarse sobre la base de la secuencia de las mismas, sin limitarse a ellas.

La formulación liofilizada de la presente invención puede utilizarse para prevenir, tratar y aliviar una enfermedad, como la deficiencia de α -galactosidasa A, cuyos síntomas pueden prevenirse, tratarse o aliviarse mediante la administración de la proteína de fusión α -galactosidasa A, sin limitarse a ella.

La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención puede utilizarse como fármaco de una terapia de reemplazo enzimático (ERT). La

terapia de reemplazo enzimático puede prevenir o tratar una enfermedad mediante la recuperación de la hipofunción de una enzima mediante la suplementación de la enzima deficiente o insuficiente que causa la enfermedad.

5 Específicamente, la formulación liofilizada de la presente invención puede utilizarse para prevenir, tratar o aliviar la deficiencia de α -galactosidasa A. La deficiencia de α -galactosidasa A es una enfermedad de almacenamiento lisosomal causada por la deficiencia de α -galactosidasa A (α -Gal A) que es una enzima lisosomal e incluye la enfermedad de Fabry, el angioqueratoma difuso, el angioqueratoma corporis difuso o la lipidosis distópica hereditaria.

10 La enfermedad de Fabry, una de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, es un trastorno hereditario recesivo causado por la inactivación del cromosoma X. La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico congénito de glicolípidos (glicoesfingolípidos) causado por una actividad deficiente o insuficiente de la α -galactosidasa A. Se sabe que la acumulación anormal de
15 globotriaosilceramida (Gb3) en la pared de los vasos sanguíneos y en varias partes del cuerpo, como la piel, los riñones, el corazón y el sistema nervioso, causada por la anomalía de la α -galactosidasa A, afecta significativamente la circulación sanguínea y reduce el suministro de nutrientes. Se producen síntomas como hipohidrosis, acroparestesia, dolor intenso, angioqueratoma,
20 opacidad corneal, isquemia cardíaca, infarto de miocardio e insuficiencia renal, y finalmente los riñones dejaron de funcionar correctamente, lo que provocó la muerte.

Tal como se utiliza en este documento, el término "prevención" se refiere a todas las acciones que inhiben o retrasan una enfermedad mediante la administración de la proteína de fusión o la formulación liofilizada, incluida la misma. Tal como se utiliza en este documento, el término "tratamiento" se refiere a todas las acciones que mejoran o cambian beneficiosamente los síntomas de una enfermedad objetivo mediante la administración de la proteína de fusión o la formulación liofilizada, incluida la misma.

En una realización específica de la presente invención, la formulación liofilizada de la presente invención puede utilizarse para prevenir o tratar la enfermedad de Fabry, sin limitarse a ella.

Además, la formulación liofilizada de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea, pero no se limita a ella. Específicamente, la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede reconstruirse para ser adecuada para la administración subcutánea, pero no se limita a ella.

Tal como se utiliza en este documento, el término "administración" se refiere a la introducción de la formulación liofilizada reconstituida en un paciente por cualquier método adecuado, y las vías de administración de la formulación liofilizada no son particularmente limitadas, pero la formulación liofilizada puede administrarse por cualquier vía general siempre que la proteína de fusión α -galactosidasa A de la formulación liofilizada alcance un objetivo en el cuerpo vivo, por ejemplo, se puede utilizar la administración intraperitoneal, la administración intravenosa, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la

administración intradérmica, la administración oral, la administración tópica, la administración intranasal, la administración intrapulmonar o la administración rectal, sin limitarse a ellas.

Una dosis diaria preferida de la proteína de fusión de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,0001 mg a 500 mg por 1 kg del peso corporal de un paciente, y la formulación liofilizada de la presente invención puede formularse de tal manera que la dosis diaria se administre o reconstruya correctamente, de modo que se administre la dosis diaria. Sin embargo, la dosis de la proteína de fusión se determina como una dosis efectiva para el paciente teniendo en cuenta diversos factores como la edad, el peso corporal, el estado de salud y el sexo del paciente, la gravedad de la enfermedad, la dieta y la tasa de excreción, así como la vía de administración y el número de administración de la misma, y por lo tanto, una dosis efectiva apropiada para un uso particular de la formulación liofilizada de la presente invención puede determinarse mediante una de las formas ordinarias de la misma habilidad en el arte teniendo en cuenta estos factores.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una solución acuosa o una formulación pre-liofilizada que incluye una proteína de fusión de α -galactosidasa A, un tampón y un aminoácido para preparar la formulación liofilizada.

La solución acuosa o la formulación preliofilizada puede incluir además al menos una seleccionada a partir de un agente isotónico, un azúcar o alcohol de

azúcar y un tensioactivo no iónico, sin limitarse a ellos.

La solución acuosa, la formulación preliofilizada, la formulación liofilizada y los componentes que la constituyen son los descritos anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para
5 preparar la formulación liofilizada.

Específicamente, el método de preparación puede incluir la liofilización de una solución acuosa que incluye una proteína de fusión de α -galactosidasa A, un tampón y un aminoácido.

La solución acuosa o la formulación liofilizada pueden incluir además al
10 menos una seleccionada a partir de un agente isotónico, un azúcar o alcohol de azúcar y un tensioactivo no iónico, sin limitarse a ellos.

La solución acuosa, la formulación liofilizada y los componentes que la constituyen son los descritos anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para
15 reconstituir la formulación liofilizada, el método incluye la adición de una solución reconstituyente a la formulación liofilizada.

La solución acuosa, la formulación liofilizada y la reconstitución son las descritas anteriormente.

Tal como se utiliza en este documento, el término "solución
20 reconstituyente" se refiere a una solución utilizada para reconstituir la formulación liofilizada agregando la solución reconstituyente a la formulación liofilizada en estado sólido. Ejemplos de la solución reconstituyente pueden

incluir agua destilada (agua), sin limitarse a ella.

La formulación reconstituida puede incluir la proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración adecuada para su administración a un individuo, específicamente, puede incluir la proteína de fusión α -galactosidasa A en una cantidad de 10 mg/ml a 100 mg/ml, 10 mg/ml a 90 mg/ml, 10 mg/ml a 50 mg/ml, o 10 mg/ml a 30 mg/ml, sin limitarse a ello.

La formulación reconstituida puede obtenerse reconstituyendo la formulación liofilizada de la presente invención para que sea adecuada para la administración subcutánea a un individuo, sin limitarse a ello.

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales. Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales se presentan simplemente para ejemplificar la presente invención, y el alcance de la presente invención no se limita a ellos.

Ejemplo 1: Preparación de la proteína de fusión de la región de la α -galactosidasa A y la inmunoglobulina Fc

Se preparó una proteína de fusión de α -galactosidasa A y una región de inmunoglobulina Fc (en lo sucesivo, proteína de fusión de α -galactosidasa A, SEQ ID NO: 4), en la que la α -galactosidasa A de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) se enlaza a una región de inmunoglobulina Fc (SEQ ID NO: 3) a través de un enlazador (SEQ ID NO: 2).

En concreto, se insertó un polinucleótido (SEQ ID NO: 5) que codifica la

proteína de fusión α -galactosidasa A en un vector XOGC, que es un vector de expresión, mediante el uso de una enzima de restricción para preparar un vector que expresa la proteína de fusión α -galactosidasa A.

Las secuencias de ADN y proteínas de la proteína de fusión α -galactosidasa A son las que se muestran en la Tabla 1 a continuación. En la
5 secuencia de proteínas de la Tabla 1 a continuación, los subrayados indican secuencias de señal, las letras en negrita indican sustitución de aminoácidos y las letras cursivas indican el enlazador. La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención se presenta en una forma dimérica que consta de dos
10 monómeros que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Tabla 1

	Secuencia	NÚMERO DE ID DE SECUENCIA:
--	-----------	----------------------------------

Proteína	<u>MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR A</u> LDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDCQEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC ID- DCWMAQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSGKLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YY- DIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DDDSWKSIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMLVI GN- FGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWTSRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG <i>GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG</i> <i>GGGSGGGGSG</i> PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VL- HQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	4
----------	--	---

ADN	<u>ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG</u> <u>GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTCCTGGCC</u> <u>CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCA</u> CTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT AC- CATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC AT- GTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TG- GAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GC- TAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA AC- CTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CT- GAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TC- CTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AG- TATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAATCAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG	5
-----	---	---

GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CT- TAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TC- CCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GC- CTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCACTGTTT TGCTTCAGCT AGAAAATACA AT- GCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC GGCGGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCCA CCA TGCCCAAG CACCTGAGTTCCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGT- GAGCCAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AA- GACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCCAA AG- CACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GT- GTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG AT- GACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GC- CGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG AT- GCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CA-	
---	--

	GAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	
--	------------------------------------	--

Las líneas celulares CHO-S se transfectaron con un vector (pX0GC-alfa galactosidasa-Fc) que expresa la proteína de fusión α -galactosidasa A preparada como se describió anteriormente para preparar líneas celulares capaces de producir en masa la proteína de fusión α -galactosidasa A.

Específicamente, las células CHO-S se cultivaron en suspensión en un matraz Erlenmeyer de 1 L (Corning, cat. No. 431147) utilizando un medio de cultivo sin suero (FreeStyle CHO Expression Medium, Thermo Fisher, cat. No. 12651014) hasta que el número de células en el recipiente de cultivo alcanzó 5×10^8 , y luego las células se transformaron utilizando un FreeStyle Max (Thermo Fisher, cat. No. 16447-100). Es decir, después de añadir 10 ml de OptiPro SFM (Thermo Fisher, cat. No. 12309-019) a cada uno de los dos tubos, y se añadieron 500 μ g de ADN a un tubo y 500 μ l del FreeStyle Max al otro tubo, seguido de la mezcla de las dos soluciones, y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por un nuevo medio de expresión FreeStyle CHO (Thermo Fisher, cat. No. 12651014). Las células se incubaron en condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂, 125 rpm durante aproximadamente 96 horas para preparar la proteína de fusión α -galactosidasa A.

En la proteína de fusión de α -galactosidasa A preparada como se ha descrito anteriormente, cada uno de los dos monómeros de la región de

inmunoglobulina Fc que constituyen el dímero se une a la α -galactosidasa A para formar una estructura en la que la región de inmunoglobulina Fc en forma dimérica se fusiona con dos moléculas de α -galactosidasa A.

Ejemplo 2: Identificación de la estabilidad de la formulación

5 Liofilizada de acuerdo con la adición de aminoácidos

Ejemplo 2-1: Preparación y reconstitución de una formulación liofilizada

Con respecto a la formulación liofilizada, incluida la proteína de fusión α -galactosidasa A preparada en el Ejemplo 1, con el fin de identificar los cambios en la estabilidad de la formulación liofilizada de acuerdo con la adición de un
10 aminoácido, se prepararon varias formulaciones liofilizadas y se realizaron análisis de apariencia y cromatografía de exclusión por tamaño en las formulaciones liofilizadas.

Para la preparación de las formulaciones liofilizadas, cada una de las soluciones de las formulaciones que tenían las composiciones que se muestran
15 en la Tabla 2 a continuación se alícuota en un vial de vidrio (3 ml) por 1.0 ml, medio girado con un tapón de goma, y cargado en un estante de un liofilizador (Lyostar 3, SP scientific). Posteriormente, la liofilización se llevó a cabo en las condiciones que se muestran en la Tabla 3 a continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completar la
20 liofilización de aluminio.

Tabla 2

#	Concentración de la proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	pH	Aminoácido (L-serina (% (p/v)))
1	10 mg/ml	20 mM de L-histidina	50 mM de cloruro de sodio	6.0	-
2	10 mg/ml	20 mM de L-histidina	150 mM de cloruro de sodio	6.0	-
3	10 mg/ml	20 mM de L-histidina	200 mM de cloruro de sodio	6.0	-
4	10 mg/ml	20 mM de L-histidina	300 mM de cloruro de sodio	6.0	-
5	10 mg/ml	20 mM de L-histidina	-	6.0	2.0

Tabla 3

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	4.0	-60	-25	20
Velocidad de calentamiento (°C/min)	0	1.0	1.0	1.0
Tiempo de espera (min)	30	300	2000	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	40	40

5 La estabilidad de la formulación liofilizada preparada se identificó

mediante el análisis de SE-HPLC después de la reconstitución utilizando 1.0 ml de agua destilada (DW).

Ejemplo 2-2: Cromatografía líquida con exclusión por tamaño (SE-HPLC)

Para la cromatografía de exclusión por tamaño, en primer lugar, la
5 formulación liofilizada reconstituida se diluyó utilizando una fase móvil (1xPBS, Lonza) a una concentración de 1.0 mg/ml, seguida de una filtración estéril, y se inyectaron 200 µl de la muestra filtrada en un inserto de vial y se prepararon en un vial con tapa de rosca.

Posteriormente, después de conectar la fase móvil a una bomba, se cargó
10 una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los dispositivos Waters e2695 y Waters 2489 (fabricados por Waters, Japón) mientras fluía la fase móvil a un caudal de 0.5 ml/min. La muestra se equilibró haciendo fluir la fase móvil a un caudal de 0.5 ml/min durante 30 minutos o más hasta que se estabilizaron las señales del detector. Cuando la temperatura de un muestreador automático se
15 redujo a 4 °C, la muestra se insertó en el muestreador. Después de inyectar 10 µl de la muestra, se identificaron picos de detección a 214 nm mientras fluía la fase móvil durante 35 minutos. Los resultados se analizaron utilizando el software Empower Pro de un ordenador personal (PC).

Ejemplo 2-3: Identificación de la estabilidad de la formulación liofilizada de
20 acuerdo con la adición de aminoácidos

En primer lugar, como resultado de la comparación entre las apariencias de las tortas de las formulaciones liofilizadas preparadas en el Ejemplo 2-1,

aunque se observó un colapso parcial en la formulación que incluía un agente isotónico (NaCl) de alta concentración, no se observó un colapso grave en la formulación liofilizada y se observaron apariencias adecuadas. En el caso de la reconstitución, la formulación liofilizada a la que se añadió serina exhibió una
5 apariencia transparente que indica una apariencia excelente (FIG. 1).

Además, como resultado de la identificación de la recuperación de la forma nativa de la formulación liofilizada preparada por cromatografía de exclusión por tamaño, se confirmó que la tasa de recuperación de la forma nativa fue del 100 % o menos en las formulaciones a las que no se añadió serina y la
10 recuperación de la forma nativa disminuyó a medida que aumentaba la concentración del agente isotónico (NaCl) pero la recuperación de la forma nativa fue de 102.0 % en la formulación que contenía serina, lo que indica que la formulación fue estable (FIG. 2).

En este sentido, la forma nativa, como la proteína de fusión de la α -galactosidasa A preparada en el Ejemplo 1, era una proteína de fusión en una
15 forma dimérica intacta en la que no se producía agregación ni degradación. La definición se puede aplicar a los siguientes ejemplos de la misma manera.

En la Tabla 4 se muestran los resultados comparativos de la estabilidad de las formulaciones liofilizadas a las que se añadió un aminoácido (serina).

Tabla 4

#	Aspecto de la tarta	Apariencia después de la disolución	Recuperación de forma nativa %
1	elegante	ligeramente turbio, sin burbujas	96.0
2	elegante	turbio, sin burbujas	97.4
3	elegante	turbio, sin burbujas	93.2
4	Parcialmente colapsado	turbio, sin burbujas	86.5
5	elegante	transparente, sin burbujas, excelente apariencia después de disolverse	102.0

Ejemplo 3: Identificación de la estabilidad de la formulación liofilizada de acuerdo con la concentración de aminoácidos

5 Ejemplo 3-1: Preparación y reconstitución de una formulación liofilizada

En primer lugar, con el fin de identificar los cambios en la estabilidad de la formulación liofilizada de acuerdo con la concentración del aminoácido en la formulación liofilizada que contiene la proteína de fusión α -galactosidasa A preparada en el Ejemplo 1, se prepararon varias formulaciones liofilizadas y se

10 realizaron análisis de apariencia y cromatografía de exclusión por tamaño en las formulaciones liofilizadas.

Cada una de las formulaciones con las composiciones que se muestran en la Tabla 5 a continuación se alícuota en un vial de vidrio (3 ml) por 0.5 ml, medio girado con un tapón de goma y cargado en un estante de un liofilizador

(Lyostar 3, SP scientific). Posteriormente, la liofilización se llevó a cabo en las condiciones que se muestran en la Tabla 6 a continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completar la liofilización de aluminio.

5

Tabla 5

#	Concentración de la proteína de fusión	Tampón	pH	Tensioactivo no iónico	Aminoácido (L-serina (% (p/v)))
1	30 mg/ml	10 mM de L-histidina	5.5	0.025 % polisorbato 20	0.25
2	30 mg/ml	10 mM de L-histidina	5.5	0.025 % polisorbato 20	0.5
3	30 mg/ml	10 mM de L-histidina	5.5	0.025 % polisorbato 20	1.0
4	30 mg/ml	10 mM de L-histidina	5.5	0.025 % polisorbato 20	2.0
5	30 mg/ml	10 mM de L-histidina	5.5	0.025 % polisorbato 20	4.0

Tabla 6

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	4.0	-60	-25	20
Velocidad de calentamiento	0	1.0	1.0	1.0

(°C/min)				
Tiempo de espera (min)	30	300	2000	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	40	40

La estabilidad de la formulación liofilizada preparada se identificó mediante el análisis de SE-HPLC después de la reconstitución utilizando 0.25 ml de agua destilada (DW). Las composiciones de las formulaciones liofilizadas reconstituidas son las que se muestran en la Tabla 7 a continuación, y el análisis de SE-HPLC se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2-2.

Tabla 7

#	Concentración de la proteína de fusión	Tampón	pH	Tensioactivo no iónico	Aminoácido (L-serina (% (p/v)))
1	60 mg/ml	20 mM de L-histidina	5.5	0.05 % polisorbato 20	0.5
2	60 mg/ml	20 mM de L-histidina	5.5	0.05 % polisorbato 20	1.0
3	60 mg/ml	20 mM de L-histidina	5.5	0.05 % polisorbato 20	2.0
4	60 mg/ml	20 mM de L-histidina	5.5	0.05 % polisorbato 20	4.0
5	60 mg/ml	20 mM de L-histidina	5.5	0.05 % polisorbato 20	8.0

Ejemplo 3-2: Identificación de la estabilidad de la formulación liofilizada de acuerdo con la concentración de aminoácidos

Como resultado de comparar la apariencia de la torta de las formulaciones liofilizadas de acuerdo con la concentración del aminoácido, no se observó un
5 colapso grave en todas las formulaciones liofilizadas y se observó una apariencia adecuada (FIG. 3).

Además, con base en la cromatografía de exclusión por tamaño, se confirmó que a medida que aumentaba la concentración de serina en la formulación liofilizada, la formación de agregados solubles disminuía (FIG. 4), la
10 recuperación de la forma nativa aumentaba (FIG. 5) y el progreso de los agregados solubles (HMW1) a los agregados de orden superior (HMW2) era más inhibido (FIG. 6). En particular, en la formulación liofilizada que contenía serina a una concentración de 2.0 % o más, se confirmó que la recuperación de la forma nativa era superior al 100 % en comparación con la anterior a la liofilización.

15 En este sentido, los agregados solubles formados a medida que se despliegan algunos dominios de la α -galactosidasa A tienen la actividad de la α -galactosidasa A mientras tienen solubilidad, y los agregados de orden superior son agregados formados a medida que avanza el despliegue de los agregados solubles. La forma nativa se refiere a la proteína de fusión α -galactosidasa A,
20 preparada en el Ejemplo 1, y es una proteína de fusión en forma dimérica intacta que no ha sufrido agregación ni degradación. A medida que se forman agregados de orden superior y aumenta el tamaño de los agregados, aumenta el riesgo de

inmunogenicidad y, por lo tanto, la seguridad de la formulación liofilizada puede aumentar inhibiendo la formación de los agregados de orden superior mediante la adición de serina.

Estos resultados experimentales indican que la formulación liofilizada que contiene el aminoácido tiene una alta seguridad y, en particular, a medida que aumenta la concentración del aminoácido, se inhibe más la formación de agregados, manteniendo así más fácilmente la pureza de la proteína de fusión α -galactosidasa A.

Los resultados de la comparación de la estabilidad de la formulación liofilizada que contiene el aminoácido (serina) confirmada como se describe anteriormente se enumeran en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

#	Aspecto de la tarta	Apariencia después de la disolución	Recuperación de la forma nativa (%)
1	Parcialmente colapsado	Claro y transparente, sin burbujas	90.4
2	Parcialmente colapsado	Claro y transparente, sin burbujas	93.5
3	Parcialmente colapsado	Claro y transparente, sin burbujas	96.9
4	Parcialmente colapsado	Claro y transparente, sin burbujas	101.9
5	Parcialmente colapsado	Claro y transparente, sin burbujas	103.8

La descripción anterior de la presente invención se proporciona con fines ilustrativos, y los expertos en la materia entenderían que se pueden realizar varios cambios y modificaciones sin cambiar la concepción técnica y las características esenciales de la presente invención. Por lo tanto, está claro que las realizaciones descritas anteriormente son ilustrativas en todos los aspectos y no limitan la presente invención. Además, el alcance de la presente invención debe definirse mediante las reivindicaciones adjuntas en lugar de la descripción detallada, y debe entenderse que todas las modificaciones o variaciones derivadas de los significados y el alcance de la presente invención y equivalentes de la misma están incluidas en el alcance de la presente invención.