

DESCRIPCIÓN

Formulación líquida que comprende una proteína de fusión que incluye α -galactosidasa A

Campo Técnico

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

Antecedentes de la Técnica

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

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

20 La enfermedad de Fabry, conocida como enfermedad por almacenamiento lisosomal, es un trastorno hereditario del metabolismo de los glicolípidos (glicoesfingolípidos) que resulta de una actividad deficiente o insuficiente de 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 inferior al 1 % en comparación con la de las personas normales y tienen un amplio rango de síntomas que incluyen dolor intenso en las extremidades (acroparestesia), hipohidrosis, cambios corneales y lenticulares, lesiones cutáneas (angioqueratoma), insuficiencia renal, enfermedad cardiovascular, insuficiencia pulmonar, síntomas del sistema nervioso y accidente cerebrovascular.

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

30 Se han realizado varios estudios sobre la terapia de reemplazo enzimático (ERT) como procedimiento representativo para tratar la enfermedad por almacenamiento lisosomal (Frances M. Platt y otros, J Cell Biol. 2012 Nov 26;199(5):723-34). En particular, dado que las enfermedades por 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 por almacenamiento lisosomal, y tiene el efecto de aliviar los síntomas existentes o retrasar el progreso de la enfermedad al reemplazar la enzima deficiente. En consecuencia, se han realizado estudios sobre diversas formulaciones que incluyen α -galactosidasa A para prevenir y tratar la deficiencia de α -galactosidasa A.

40 Sin embargo, en el caso de las formulaciones, la composición de una formulación para obtener estabilidad varía significativamente según la estructura, las propiedades fisicoquímicas, la dosis, etc., de un ingrediente activo (por ejemplo, un fármaco proteico), y por lo tanto es esencial desarrollar una composición particular adecuada para el ingrediente activo, y el desarrollo de una formulación que incluya α -galactosidasa A es insuficiente. En particular, en el caso de una formulación líquida que incluye una proteína de fusión de α -galactosidasa A una concentración alta, la estabilidad de almacenamiento se deteriora considerablemente debido a un problema tal como la precipitación de proteínas y, por lo tanto, las formulaciones líquidas convencionales incluyen una proteína de fusión de α -galactosidasa A una concentración de 1 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

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

Solución al problema

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

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar la formulación líquida.

5 Efectos ventajosos de la invención

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

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra los resultados de las mediciones de los valores de T_m y T_{agg} de acuerdo con el cambio de pH.
- La Figura 2 muestra los valores de T_m identificados en la Figura 1.
- La Figura 3 muestra los valores de T_{agg} identificados en la Figura 1.
- 15 La Figura 4 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados solubles durante el almacenamiento a temperatura ambiente de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- La Figura 5 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de fragmentos durante el almacenamiento a temperatura ambiente de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- La Figura 6 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de la recuperación de la forma nativa durante el almacenamiento a temperatura ambiente de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- 20 La Figura 7 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados solubles durante el almacenamiento en frío de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- La Figura 8 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de fragmentos durante el almacenamiento en frío de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- 25 La Figura 9 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de la recuperación de la forma nativa durante el almacenamiento en frío de acuerdo con el cambio de pH de una formulación líquida.
- La Figura 10 muestra los resultados del análisis SE-HPLC (Figura 10(a)) y del análisis de actividad biológica (Figura 10(b)) de una proteína de fusión de α -galactosidasa A de formulaciones líquidas con pH 6,0 y pH 8,0.
- La Figura 11 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados solubles de acuerdo con la concentración de un agente isotónico de una formulación líquida.
- 30 La Figura 12 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de fragmentos de acuerdo con la concentración de un agente isotónico de una formulación líquida.
- La Figura 13 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de recuperación de la forma nativa de acuerdo con la concentración de un agente isotónico de una formulación líquida.
- 35 La Figura 14 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de estabilidad acelerada de acuerdo con el tipo de aminoácido de una formulación líquida.
- La Figura 15 muestra los resultados de la medición de los valores de T_m de acuerdo con la concentración de un aminoácido.
- La Figura 16 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados solubles de acuerdo con la concentración de un aminoácido de una formulación líquida.
- 40 La Figura 17 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de recuperación de la forma nativa de acuerdo con la concentración de un aminoácido de una formulación líquida.
- La Figura 18 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados solubles de acuerdo con la concentración de un aminoácido de una formulación líquida que incluye una alta concentración (50 mg/ml) de una proteína de fusión.
- 45 La Figura 19 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de la recuperación de la forma nativa de acuerdo con la

concentración de un aminoácido de una formulación líquida que incluye una alta concentración (50 mg/ml) de una proteína de fusión.

La Figura 20 muestra el cromatograma SE-HPLC de una formulación líquida que incluye una alta concentración (50 mg/ml) de una proteína de fusión.

5 La Figura 21 muestra los resultados del análisis SE-HPLC de agregados de HMW1 y HMW2 en una formulación líquida que incluye una alta concentración (50 mg/ml) de una proteína de fusión.

La Figura 22 muestra el aspecto de una formulación líquida que incluye una alta concentración (90 mg/ml) de una proteína de fusión.

10 La Figura 23 muestra la turbidez de una formulación líquida que incluye una alta concentración (90 mg/ml) de una proteína de fusión.

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

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

15 En una realización específica, la formulación líquida se caracteriza por incluir una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está unida a una región Fc de inmunoglobulina; un tampón; un agente isotónico; y un aminoácido.

En otra realización específica, la formulación líquida se caracteriza por incluir la proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml a 90 mg/ml; un tampón para mantener el pH de la formulación líquida en un intervalo de 5,0 a 6,5; y un aminoácido a una concentración de 0,1 % (p/v) a 4,0 % (p/v).

20 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir la proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml a 90 mg/ml; un tampón para mantener un pH de la formulación líquida en un intervalo de 5,5 a 6,5; y un aminoácido a una concentración de 0,5 % (p/v) a 4,0 % (p/v).

La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir la proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 50 mM; y serina de 1,0 % (p/v) a 4,0 % (p/v).

25 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir la proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 50 mM; cloruro de sodio de 50 mM a 200 mM; y serina de 1,0 a 4,0 % (p/v).

30 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el tampón incluye histidina o una sal de la misma, 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 mismos.

La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza por incluir además un agente isotónico.

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

35 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el agente isotónico está contenido a una concentración de 50 mM a 200 mM.

La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en arginina, serina, treonina, glutamina, glicina, alanina y cualquier combinación de los mismos.

40 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la formulación líquida comprende además un tensioactivo no iónico a una concentración de 0,005 % (p/v) a 0,1 % (p/v).

La formulación líquida 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.

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

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

- 5 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la región Fc de inmunoglobulina está aglicosilada.

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

- 10 La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la formulación líquida se usa para prevenir o tratar la enfermedad de Fabry.

La formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones específicas se caracteriza porque la formulación líquida se administra a través de una vía subcutánea.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para preparar la formulación líquida.

- 15 En una realización específica, el procedimiento para preparar la formulación líquida incluye mezclar la proteína de fusión de α -galactosidasa A; un tampón; y un aminoácido.

En otra realización específica, el procedimiento para preparar la formulación líquida incluye mezclar adicionalmente la formulación líquida con un agente isotónico, un tensioactivo no iónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos.

- 20 Modo para la invención

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

- 25 Mientras tanto, cada una de las descripciones y realizaciones divulgadas en la presente memoria se puede aplicar en la presente memoria para describir diferentes descripciones y realizaciones. Esto es, todas las combinaciones de varios elementos divulgados en la presente memoria pertenecen al ámbito de la presente invención. Además, el ámbito de la presente invención no debería estar limitado por las descripciones detalladas proporcionadas a continuación.

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar, mediante el uso de no más que la experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la presente invención. Se pretende que esos equivalentes estén abarcados en el ámbito de las siguientes reivindicaciones.

- 30 En toda la memoria descriptiva, no solo se usan los códigos convencionales de una o tres letras para los aminoácidos naturales, sino también los códigos de tres letras que generalmente se permiten para otros aminoácidos, tales como Aib (ácido 2-aminoisobutírico), Sar (N-metilglicina), ácido α -metil-glutámico. Además, los aminoácidos mencionados en la presente memoria se abrevian de acuerdo con las reglas de nomenclatura de la IUPAC-IUB de la siguiente manera.

- | | | |
|----|-------------------|------------------------|
| 35 | alanina Ala, A | arginina Arg, R |
| | asparagina Asn, N | ácido aspártico Asp, D |
| | cisteína Cys, C | ácido glutámico Glu, E |
| | glutamina Gln, Q | glicina Gly, G |
| | histidina His, H | isoleucina Ile, I |
| 40 | leucina Leu, L | lisina Lys, K |
| | metionina Met, M | fenilalanina Phe, F |
| | prolina Pro, P | serina Ser, S |
| | treonina Thr, T | triptófano Trp, W |
| | tirosina Tyr, Y | valina Val, V |

- 45 Un aspecto de la presente invención proporciona una formulación líquida que incluye una proteína de fusión en la que

la α -galactosidasa A está unida a una región Fc de inmunoglobulina.

Específicamente, la presente invención se refiere a una formulación líquida que incluye una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está unida a una región Fc de inmunoglobulina en una cantidad farmacológicamente eficaz, un tampón y un aminoácido. Además, la formulación líquida de la presente invención puede incluir además un agente isotónico, un tensioactivo no iónico, un conservante o cualquier combinación de los mismos, sin limitarse a ellos.

Como se usa en la presente memoria, el término "formulación líquida" se refiere a un fármaco formulado en forma líquida e incluye tanto una formulación líquida para uso interno como una formulación líquida para uso externo.

La formulación líquida de la presente invención incluye una sustancia que mantiene y/o almacena de manera estable la proteína de fusión de α -galactosidasa A que tiene eficacia farmacológica durante un cierto período de tiempo mientras la proteína de fusión de α -galactosidasa A se formula en una fase líquida. Un componente contenido en la formulación líquida además de la proteína de fusión α -galactosidasa A que tiene eficacia farmacológica se puede usar de manera intercambiable con un estabilizador. Como se usa en la presente memoria, el término "estabilizador" se refiere a una sustancia que mantiene estable un componente de una formulación tal como un ingrediente activo durante un cierto período de tiempo.

La formulación líquida de la presente invención se caracteriza por incluir una composición de un estabilizador capaz de estabilizar una estructura de la proteína de fusión de manera que la eficacia farmacológica de la proteína de fusión α -galactosidasa A se mantenga incluso después de un almacenamiento prolongado.

La proteína de fusión de α -galactosidasa A de la presente invención tiene una estructura en la que la α -galactosidasa A está fusionada a una región Fc de inmunoglobulina y un fenómeno de desplegamiento, en el que la estructura de la proteína se despliega por diversos factores externos (por ejemplo, pH, temperatura, ósmosis y presencia de estabilizador), provoca la pérdida de actividad enzimática lo que da como resultado una disminución significativa en la eficacia farmacológica de la formulación que incluye α -galactosidasa. En particular, la α -galactosidasa A reacciona sensiblemente con el entorno de pH de manera que uno de los dos dominios que constituyen la α -galactosidasa A se despliega primero (para formar agregados solubles) y el otro dominio de la α -galactosidasa A y la región Fc de inmunoglobulina se despliegan secuencialmente para formar agregados de orden superior y, finalmente, el desplegamiento de los dominios CH2 y CH3 de la región Fc de la inmunoglobulina (para formar agregados insolubles) que provoca precipitados reconocibles mediante observación visual. La estructura de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede no mantenerse debido a un estrés generado mientras se almacena la formulación líquida, y el riesgo de inmunogenicidad aumenta cuando se forman agregados solubles o agregados de orden superior, lo que causa un problema de seguridad.

Los presentes inventores descubrieron no sólo que incluir una composición que inhiba el desplegamiento de la proteína de fusión α -galactosidasa A es importante para la estabilidad de la formulación líquida, sino también que la actividad enzimática de la α -galactosidasa A se mantiene ya que la estructura de un sitio activo se retiene hasta que se forman agregados insolubles incluso después de que la α -galactosidasa A se despliega y se forman agregados solubles a partir de ella, e identificaron que es importante ajustar el pH y agregar un estabilizador (por ejemplo, un aminoácido) para mantener la estabilidad estructural de la proteína de fusión α -galactosidasa A tanto como sea posible y, además, para evitar la formación de agregados insolubles causada a medida que avanza el fenómeno de desplegamiento de los agregados solubles, lo que completa la presente invención. La formulación líquida de la presente invención puede mantener la estructura y actividad de la proteína de fusión incluso después de un almacenamiento prolongado y tener una alta seguridad de medicación debido a su baja inmunogenicidad.

En un ejemplo específico, la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede incluir: una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está unida a una región Fc de inmunoglobulina; un tampón; y un aminoácido, más específicamente, incluye: una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; un tampón; y un aminoácido de 0,1 % (p/v) a 4,0% (p/v), en el que el pH es de 5,0 a 6,5.

Además, en otro ejemplo, la formulación líquida puede incluir: una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; un tampón; y un aminoácido de 0,5 % (p/v) a 4,0 % (p/v), en el que el pH es de 5,5 a 6,5.

Además, en otro ejemplo, la formulación líquida puede incluir: una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 50 mM; y serina de 1,0 % (p/v) a 4,0 % (p/v), pero la formulación líquida de la presente invención no se limita a esto.

La formulación líquida de la presente invención puede incluir la proteína de fusión α -galactosidasa A una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a 150 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 130 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a 100 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 100 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml a 90 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a 90 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a 50 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml a 90 mg/ml, sin limitarse a ello.

Como se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" refiere a un rango que incluye todo de $\pm 0,5$, $\pm$

0,4, $\pm$ 0,3, $\pm$ 0,2, $\pm$ 0,1, $\pm$ 0,01 o similar, e incluye todos los valores equivalentes que vienen inmediatamente después del término "aproximadamente" o aquellos en un rango similar, pero no se limita a esto.

Generalmente se sabe que a medida que aumenta la concentración de una proteína contenida en una formulación, es difícil mantener la estabilidad de la formulación y se produce el problema de los precipitados. Sin embargo, dado que la formulación líquida de la presente invención tiene una composición capaz de mantener la estructura de la proteína de fusión sin causar precipitados aunque la proteína de fusión esté contenida a una concentración alta, la proteína de fusión α -galactosidasa A puede estar contenida en la misma, como un ingrediente activo, 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 aproximadamente 90 mg/ml.

El tampón, como componente contenido en la formulación líquida de la presente invención, es una solución que se usa para mantener el pH de la formulación líquida para estabilizar la proteína de fusión α -galactosidasa A. La formulación líquida de la presente invención puede incluir el tampón como disolvente de la formulación líquida, y se puede usar cualquier tampón sin limitación siempre que el tampón mantenga el nivel de pH en el que la proteína de fusión α -galactosidasa A, como sustancia diana de estabilización, se estabiliza.

En un experimento de la presente invención, se confirmó que la estructura de la proteína de fusión cambia de acuerdo con el nivel de pH de la formulación líquida, específicamente, la mayor estabilidad estructural de la proteína de fusión se obtuvo a un pH de 5,5 a 6,5. Además, entre los componentes que constituyen la proteína de fusión, la α -galactosidasa A se ve afectada más significativamente por el nivel de pH que por la región Fc de inmunoglobulina, que debe desplegarse en función del valor de pH. Por lo tanto, es importante mantener la estabilidad estructural de la proteína de fusión α -galactosidasa A mediante el mantenimiento del pH de la formulación líquida a un nivel apropiado.

El tampón puede incluir ácido fosfórico y una sal alcalina del mismo, como una sal conjugada (por ejemplo, fosfato: fosfato de sodio, fosfato de potasio o sal de hidrógeno o dihidrógeno de los mismos), ácido cítrico y una sal del mismo (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 las mismas puede usarse como tampón, sin limitarse a ello. Por ejemplo, el tampón se puede seleccionar 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 de fosfato de sodio), un tampón de histidina y cualquier combinación de los mismos, y el tampón o la sustancia utilizada como tampón en la formulación líquida (ácido cítrico y una sal del mismo, ácido acético y una sal del mismo, histidina y una sal de la misma, ácido fosfórico y una sal del mismo, o cualquier combinación de los mismos) pueden estar contenidos a una concentración suficiente para mantener un pH objetivo de la formulación líquida.

El pH de la formulación líquida puede ser de aproximadamente 5,0 a 8,0, por ejemplo, de aproximadamente 5,0 a 7,5, de aproximadamente 5,0 a 7,0, de aproximadamente 5,0 a 6,5, de aproximadamente 5,0 a 6,0, de aproximadamente 5,5 a 8,0, de aproximadamente 5,5 a 7,5, de aproximadamente 5,5 a 7,0, de aproximadamente 5,5 a 6,5, de aproximadamente 5,5 a 6,3, de aproximadamente 5,5 a 6,2, de aproximadamente 5,5 a 6,1, de aproximadamente 5,5 a 6,0, de aproximadamente 5,5 a 5,9, de aproximadamente 5,5 a 5,8, de aproximadamente 5,5 a 5,7, de aproximadamente 5,5 a 5,6, de aproximadamente 6,0 a 6,5, o aproximadamente 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, o 6,5, pero no se limita particularmente a los mismos.

Para obtener el pH objetivo, el tampón puede incluir ácido fosfórico, ácido 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 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 estar limitado a los mismos.

En una realización específica, el tampón puede incluir histidina 20 mM y tener un pH de aproximadamente 5,5 a 6,5, sin limitarse a ello.

El aminoácido, como otro tipo de estabilizador contenido en la formulación líquida de la presente invención, puede mantener el estado de los agregados solubles de la proteína de fusión α -galactosidasa A en la formulación líquida. Una vez que se forman los agregados insolubles a medida que avanza la deformación estructural (desplegamiento) de los agregados solubles, ocurren problemas tales como precipitación y pérdida de actividad enzimática.

En el ejemplo experimental de la presente invención, se confirmó que el progreso del desplegamiento de la proteína de fusión α -galactosidasa A se inhibe mediante la adición del aminoácido, de modo que se evita la formación de agregados de orden superior y se evita la formación de agregados insolubles a partir de los mismos. Además, se confirmó que el aminoácido previene los precipitados de la proteína al inhibir la formación de agregados de orden superior y tiene una gran influencia en el aumento de la estabilidad en una formulación líquida que tiene una alta concentración de la proteína de fusión α -galactosidasa A. Debido a que la formación de agregados solubles o agregados de orden superior puede causar inmunogenicidad cuando se administra al cuerpo, es necesario inhibir la

formación de agregados solubles o agregados de orden superior.

El aminoácido contenido en la formulación líquida de la presente invención puede ser arginina, lisina, serina, treonina, asparagina, glutamina, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o cualquier combinación de los mismos, específicamente, puede seleccionarse del grupo que consiste en arginina, serina, treonina, glutamina, glicina, alanina y cualquier combinación de los mismos, sin limitarse a los mismos. Como ejemplo específico, el aminoácido puede ser serina, sin limitarse a ello.

En la formulación líquida de la presente invención, el aminoácido puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 % (p/v) a 5,0 % (p/v), aproximadamente 0,5 % (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 5,0 % (p/v), aproximadamente 2,5 % (p/v) a 5 % (p/v), aproximadamente 3,0 % (p/v) a 5 % (p/v), aproximadamente 3,5 % (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 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 formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede incluir además un agente isotónico. El agente isotónico es una sustancia añadida para ajustar una presión osmótica de la formulación líquida, y cualquier agente isotónico puede estar contenido en la formulación líquida de la presente invención sin limitación siempre que el agente isotónico contribuya a la estabilización de la proteína de fusión de α -galactosidasa A y mantenga una presión osmótica adecuada.

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

En el ejemplo experimental de la presente invención, se confirmó que el agente isotónico inhibe la formación de agregados solubles y ayuda a mantener la forma nativa de la proteína de fusión en la formulación líquida de la presente invención.

La concentración de cloruro de sodio utilizada en la presente invención puede ser de aproximadamente 0 mM a 300 mM, específicamente, de aproximadamente 0,1 mM a 300 mM, también puede ser de 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, 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 los mismos, y puede ajustarse apropiadamente de manera que las formulaciones, incluidas todas las mezclas, deben ser isotónicas de acuerdo con los tipos y cantidades de componentes contenidos en las formulaciones.

La formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede incluir además un tensioactivo no iónico. El tensioactivo no iónico reduce la tensión superficial de una solución de proteína para evitar que la proteína sea absorbida o se agregue a una superficie hidrofóbica.

Los ejemplos del tensioactivo no iónico disponible en la presente invención pueden incluir polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20 (monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán), polisorbato 40 (monopalmitato de polioxietileno (20) sorbitán), polisorbato 60 (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán), polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán); 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 polioxietileno alquílico (alquilo: C1-C30), éter monoalílico de polioxietileno, copolímero de alquilfenilpolioxietileno (alquilo: C1-C30), y similares), y dodecilsulfato de sodio (SDS), o puede ser polisorbato o poloxámero, usado solo 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 usarse en combinación, sin limitarse a los mismos.

En la presente invención, el tensioactivo no iónico puede estar contenido en la formulación líquida de la presente invención a una concentración de aproximadamente 0,2 % (p/v) o menos, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 % (p/v) a aproximadamente 0,2 % (p/v), aproximadamente 0,001 % (p/v) a aproximadamente 0,1 % (p/v), aproximadamente 0,005 % (p/v) a aproximadamente 0,1 % (p/v), aproximadamente 0,001 % (p/v) a aproximadamente 0,08 % (p/v), aproximadamente 0,002 % (p/v) a aproximadamente 0,08 % (p/v), aproximadamente 0,005 % (p/v) a aproximadamente 0,05 % (p/v), aproximadamente 0,01 % (p/v) a aproximadamente 0,05 % (p/v), o aproximadamente 0,05 % (p/v), sin estar limitado a estas.

La formulación líquida 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 formulación líquida. Ejemplos de los mismos pueden incluir manosa, glucosa, fructosa,

galactosa, fucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, 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 estos. Por ejemplo, el azúcar puede ser sacarosa, sin limitarse a ello.

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 cetona del azúcar están sustituidos con grupos alcohol y un azúcar que contiene múltiples grupos hidroxilo. El azúcar o el alcohol de 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 que consiste en manitol y sorbitol, sin limitarse a ellos.

El alcohol de azúcar, el azúcar o cualquier combinación de los mismos puede estar presente en la formulación líquida a una concentración 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 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 20 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v) a 15 % (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 5 % (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 base a la solución completa de la formulación líquida, sin limitarse a estas.

La formulación líquida 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 añade a la formulación para facilitar la producción de la formulación para administración múltiple. Ejemplos de conservantes potenciales pueden incluir cloruro de octadecildimetilbencilamonio, 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 alcoholes aromáticos como fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabeno tal como metil o propilparabeno; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y 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 la misma.

Mientras tanto, la formulación líquida de la presente invención puede incluir además opcionalmente otros componentes o sustancias conocidas en la técnica además del tampón, agente isotónico, aminoácido, tensioactivo no iónico y conservante descritos anteriormente dentro de un rango que no perjudica el efecto de la presente invención, sin limitarse a ello.

Como ejemplo específico, la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede ser una formulación líquida que incluye una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 50 mM; y serina de 1,0 % (p/v) a 4,0 % (p/v), sin limitarse a ello.

Como otro ejemplo específico, la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede ser una formulación líquida que incluye una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 30 mM; y serina de 2,0 % (p/v) a 4,0 % (p/v), en el que el pH es de 5,5 a 6,0, sin limitarse a ello.

Como otro ejemplo específico, la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede ser una formulación líquida que incluye una proteína de fusión de 10 mg/ml a 90 mg/ml; histidina de 10 mM a 30 mM; cloruro de sodio de 50 mM a 150 mM; y serina de 2,0 % (p/v) a 4,0 % (p/v), en el que el pH es de 5,5 a 6,0, sin limitarse a ello.

Además, la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente y similares, y estos vehículo y excipiente pueden no existir de forma natural.

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

La proteína de fusión de α -galactosidasa A contenida en la formulación líquida de la presente invención se refiere a una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está unida a una región Fc de inmunoglobulina, y la proteína de fusión puede tener una estructura en la que dos moléculas de α -galactosidasa A están unidas a la región Fc de inmunoglobulina en forma dimerica a través de un enlazador. Específicamente, se pueden unir dos moléculas de α -galactosidasa A cada monómero de la región Fc de inmunoglobulina en forma dimerica a través de un enlazador. Además, las dos moléculas de α -galactosidasa A pueden formar un dímero a través de un enlace no covalente, sin estar limitado a ello. La proteína de fusión de la presente invención tiene una mayor estabilidad de la α -galactosidasa A ya que la región Fc de la inmunoglobulina está fusionada con la α -galactosidasa A y, por tanto, la eficacia farmacológica puede mantenerse durante un largo tiempo en el cuerpo. La formulación líquida de la presente invención no pierde la eficacia farmacológica incluso después de un almacenamiento prolongado porque la formulación líquida incluye además un estabilizador y con ello se obtiene una alta estabilidad.

- 5 Específicamente, la proteína de fusión de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o puede estar codificada por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, sin limitarse a ello. En la proteína de fusión de la presente invención, dos monómeros que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 pueden formar un dímero, sin limitarse a ello. Para la proteína de fusión de la presente invención se incorpora como referencia la memoria descriptiva del documento WO 2019/009684.
- Como se usan en la presente memoria, los términos "proteína de fusión en la que se fusionan α -galactosidasa A y una región Fc de inmunoglobulina", "proteína de fusión de α -galactosidasa A" y "proteína de fusión" pueden usarse indistintamente.
- 10 La proteína de fusión de la presente invención se expresa en un transformante en una forma en la que la α -galactosidasa A está unida a la región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador de modo que la α -galactosidasa A forma un dímero a través de un enlace no covalente cuando la región Fc de inmunoglobulina forma un dímero.
- 15 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 restos de α -galactosilo 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 por almacenamiento lisosomal. La α -galactosidasa A tiene una estructura dimérica que consiste en dos dominios (dominio de barril TIM y dominio similar a inmunoglobulina que contiene lámina β) (Journal of Biological chemistry, Vol. 287, No. 34, 2012; Lieberman y otros, Biochemistry, Vol. 48, No. 22, 2009), y un fenómeno de desplegamiento ocurre más fácilmente a medida que aumenta el pH y, por lo tanto, es necesario ajustar apropiadamente el pH de una formulación líquida que contiene α -galactosidasa A. En particular, si bien 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 desplegamiento y, por lo tanto, se requiere que la formulación líquida incluya un estabilizador para mantener la enzima en el estado activo y mantenga 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 la formulación líquida se administra al cuerpo. Por lo tanto, es importante aumentar la seguridad de la medicación mediante el aumento de 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, incluye una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, sin limitarse a ello.
- 25 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 están alterados por uno seleccionado del grupo que consiste en sustitución, adición, delección, modificación y cualquier combinación de estos, sin limitación, siempre que tengan actividad idéntica o equivalente a la de la forma nativa de la enzima.
- 30 Además, la α -galactosidasa A puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60 %, 70 % u 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente, al menos el 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 a partir de microorganismos mediante el uso de un procedimiento de ingeniería genética o estar disponible comercialmente, sin limitarse a ello.
- 35 Como se usa en la presente memoria, el término "homología" se refiere a un grado de identidad con una secuencia de aminoácidos de tipo salvaje o una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, y la comparación de homología se puede realizar mediante observación visual o mediante el uso de un programa de comparación disponible comercialmente. Al usar un programa informático disponible comercialmente, la homología entre dos o más secuencias se puede expresar como porcentaje (%). La homología (en %) puede calcularse entre secuencias adyacentes.
- 40 La información genética de las secuencias de la α -galactosidasa A o derivados de la misma y las secuencias de nucleótidos que codifican la misma pueden estar disponibles en bases de datos conocidas tales como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).
- 45 La proteína de fusión de α -galactosidasa A de la presente invención se puede preparar al expresar la proteína de fusión en un transformante en una forma en la que la α -galactosidasa A está unida a la región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador.
- 50 El enlazador es un enlazador peptídico, y la proteína de fusión de la presente invención puede estar en una forma en la que la α -galactosidasa A esté unida a la región Fc de inmunoglobulina a través del enlazador peptídico. Un extremo del enlazador puede estar unido a una de las cadenas de la región Fc de inmunoglobulina en forma de dímero, sin limitarse a ello.
- 55 El enlazador peptídico puede incluir uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 1.000 aminoácidos, e incluyen cualquier enlazador peptídico conocido en la técnica, tal como enlazador [GS]_x, enlazador [GGGS]_x y enlazador

[GGGGS]_x, en el que x es un número natural como 1 o mayor (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o mayor), sin limitarse a ello. Específicamente, el enlazador peptídico de la presente invención puede consistir en 10 a 50 aminoácidos, más específicamente de 20 a 40 aminoácidos, y puede tener la 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 Fc de inmunoglobulina a los que está unido el enlazador peptídico no están particularmente limitados siempre que la actividad de la α -galactosidasa A se conserve después de unirse a la región Fc de inmunoglobulina. Específicamente, los sitios pueden ser ambos extremos de la α -galactosidasa A y la región Fc de inmunoglobulina, más específicamente, el extremo C de la α -galactosidasa A y el extremo N de la región Fc de inmunoglobulina, sin limitarse a ello.

Como se usa en la presente memoria, el término "extremo N" o "extremo C" se refiere al extremo amino y al extremo carboxilo de las proteínas respectivas. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, no sólo los últimos restos de aminoácidos del extremo N o del extremo C sino también restos de aminoácidos cerca del extremo N o del extremo C, específicamente, hasta el 10^{mo} residuo de aminoácido desde el último aminoácido.

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

La región Fc de inmunoglobulina, que es uno de los restos que constituyen la proteína de fusión enzimática de la presente invención, puede ser un dímero formado por monómeros de regiones Fc de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente memoria, 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), con exclusión de los dominios variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina. En vista de los objetos de la presente invención, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir una región bisagra modificada, sin limitarse a ello. Específicamente, la región Fc de inmunoglobulina puede ser aquella en la que uno o más aminoácidos están alterados de la forma nativa de la región Fc de inmunoglobulina por uno seleccionado del grupo que consiste en sustitución, adición, delección, modificación y cualquier combinación de las mismas, sin limitarse a ello.

La región Fc de inmunoglobulina es una sustancia que se utiliza como vehículo en la producción de fármacos. Para estabilizar una proteína y evitar que sea eliminada por el riñón, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones exhaustivas sobre proteínas de fusión que usan la región Fc de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas son componentes principales de la sangre y hay cinco tipos diferentes, es decir, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El tipo que se usa con mayor frecuencia para los estudios de proteínas de fusión es IgG, y se clasifica en cuatro subtipos (IgG1 a IgG4).

La región Fc de inmunoglobulina puede incluir una región bisagra en el dominio constante de la cadena pesada, los monómeros de la región Fc de inmunoglobulina pueden constituir un dímero a través de la región bisagra, sin limitarse a ello. Además, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser una región Fc extendida que incluye una parte o la totalidad de un dominio constante 1 de cadena pesada (CH1) y/o un dominio constante 1 de cadena ligera (CL1) excluyendo los dominios variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de la inmunoglobulina, siempre que la región Fc de la inmunoglobulina tenga efectos sustancialmente idénticos o mejorados en comparación con la forma nativa. Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región de la que se elimina una parte considerablemente larga de la secuencia de aminoácidos correspondiente a CH2 y/o CH3.

Específicamente, la región Fc de inmunoglobulina 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, 5) una combinación entre uno o dos 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 ello. Más específicamente, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, pero no se limita a ello.

Como se usa en la presente memoria, el término "secuencia bisagra" se refiere a un sitio ubicado en una cadena pesada y que forma el dímero de la región Fc de inmunoglobulina a través de un interenlace disulfuro. En la presente invención, el dímero está formado por dos moléculas de la cadena Fc de inmunoglobulina a través de la secuencia bisagra de la región Fc de inmunoglobulina.

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

La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluye no sólo una secuencia nativa obtenida de la

- digestión con papaína de inmunoglobulina sino también derivados, productos de sustitución y variantes de los mismos, por ejemplo, secuencias diferentes de la secuencia nativa y obtenidas mediante modificación de uno o más residuos de aminoácidos mediante delección, adición, sustitución conservativa o no conservativa, o una combinación de las mismas. 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, se pueden usar como sitio adecuado para la modificación residuos de aminoácidos que se sabe que son importantes en el enlace en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331.
- Además, se pueden utilizar otros diversos 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 N de una forma Fc nativa, y se añade un residuo de metionina al extremo N de la forma Fc nativa. Además, para eliminar funciones efectoras, se puede eliminar un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q, y se puede eliminar un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las técnicas para preparar tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se divulgan en las publicaciones de patentes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478.
- Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios de residuos de aminoácidos que ocurren más comúnmente son 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 Fc de inmunoglobulina descritos anteriormente son derivados que tienen una actividad biológica equivalente a la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención y una estabilidad estructural mejorada frente al calor, el pH o similares.
- Además, estas regiones Fc de inmunoglobulina pueden obtenerse de formas nativas aisladas de humanos y otros animales que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales o microorganismos transformados. En este sentido, pueden obtenerse a partir de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de inmunoglobulinas totales de humanos o animales vivos y se tratan con una proteasa. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en regiones Fab y Fc y la pepsina digiere la inmunoglobulina nativa en fragmentos pF'c y F(ab)2. Estos fragmentos pueden someterse a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c. En una realización más específica, una región Fc de inmunoglobulina de origen humano es una región Fc de inmunoglobulina recombinante obtenida de un microorganismo.
- Además, la región Fc de inmunoglobulina puede tener glicanos naturales o glicanos aumentados o disminuidos en comparación con el tipo natural, o estar en forma desglicosilada. El aumento, la disminución o la eliminación de glicanos de la Fc de inmunoglobulina puede lograrse mediante cualquier procedimiento usado comúnmente en la técnica tal como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética mediante el uso de un microorganismo. A este respecto, la región Fc de inmunoglobulina obtenida mediante la eliminación de glicanos muestra una disminución significativa en la afinidad de unión a un c1q del complemento y una disminución o pérdida de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o citotoxicidad dependiente del complemento y, por lo tanto, no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias en organismos vivos. En base a esto, una región Fc de inmunoglobulina desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuada como vehículo de fármaco para su propio fin.
- Como se usa en la presente memoria, el término "desglicosilación" se refiere a una región Fc de la cual se elimina el glicano mediante el uso de una enzima y el término "aglicosilación" se refiere a una región Fc que no está glicosilada y se produce en procariotas, más específicamente, *E. coli*.
- Mientras tanto, la región Fc de inmunoglobulina puede derivar de humanos o animales tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas o cobayas. En una realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina puede derivar de humanos.
- Además, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de IgG, IgA, IgD, IgE o IgM, o cualquier combinación o híbrido de las mismas. En una realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG o IgM, que son las proteínas más abundantes en la sangre humana, y en una realización incluso más específica, se deriva de IgG, que se sabe que mejora las vidas medias de las proteínas de unión a ligandos. En una realización incluso más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4, y en la realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana, pero no se limita a ello. La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero no se limita a la misma. Más específicamente, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir un monómero que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y la región Fc de inmunoglobulina puede ser un homodímero

de los monómeros que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, sin estar limitado a ello.

Mientras tanto, como se usa en la presente memoria, el término "combinación" se refiere a la formación de un enlace entre un polipéptido que codifica una región Fc de inmunoglobulina monocatenaria del mismo origen y un polipéptido monocatenario de un origen diferente cuando se forma un dímero o un multímero. Es decir, se puede preparar un dímero o multímero mediante el uso de dos o más fragmentos Fc seleccionados del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

La región Fc de inmunoglobulina 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, dos cadenas pueden estar unidas a través del átomo de nitrógeno de una de las dos cadenas, sin estar limitado a ello. El enlace a través del átomo de nitrógeno puede formarse mediante aminación reductora de un grupo ϵ -amino de lisina o un grupo amino N-terminal, sin limitarse a ello. En una realización específica, la región Fc de inmunoglobulina puede unirse al enlazador a través de un átomo de nitrógeno de prolina en el extremo N, sin limitarse a ello. 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 estar limitado a ello.

A menos que se indique lo contrario, las descripciones detalladas sobre la α -galactosidasa A o proteína de fusión de la presente invención divulgada en la memoria descriptiva o las reivindicaciones se pueden aplicar no sólo a la α -galactosidasa A o proteína de fusión sino también a una sal de la misma (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable), o una forma solvatada de la misma. Por lo tanto, aunque en la memoria descriptiva sólo se describen " α -galactosidasa A" o "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. Tales sales pueden estar, por ejemplo, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los tipos de sales no están particularmente limitados. Sin embargo, las sales pueden estar en una forma segura y eficaz en mamíferos, sin limitarse a ello.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que puede usarse eficazmente para el uso previsto dentro del ámbito de decisión fármaco-médica sin inducir un exceso de toxicidad, irritación, respuestas alérgicas y similares.

Como se usa en la presente memoria, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal derivada de un ácido inorgánico, ácido orgánico o bases farmacéuticamente aceptable. Los 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. Los ejemplos de la sal derivada de una base adecuada pueden incluir metales alcalinos tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos tales como magnesio y amonio.

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

La proteína de fusión se puede preparar o producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, específicamente, se puede obtener a partir de células animales en las que se inserta un vector de expresión después de cultivar y purificar las células animales, o se puede sintetizar en base a la secuencia de la misma, sin limitarse a ello.

La formulación líquida de la presente invención se puede usar para prevenir, tratar y aliviar una enfermedad, tal como la deficiencia de α -galactosidasa A, cuyos síntomas se pueden prevenir, tratar o aliviar mediante la administración de la proteína de fusión de α -galactosidasa A, sin limitarse a ello.

La proteína de fusión de α -galactosidasa A de la presente invención puede usarse como fármaco para la terapia de reemplazo enzimático (ERT). La terapia de reemplazo enzimático puede prevenir o tratar una enfermedad mediante la recuperación de la función deficiente de una enzima al complementar la enzima deficiente o insuficiente que causa la enfermedad.

Específicamente, la formulación líquida de la presente invención se puede usar para prevenir, tratar o aliviar la deficiencia de α -galactosidasa A. La deficiencia de α -galactosidasa A es una enfermedad por 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 lipidosi distópica hereditaria.

La enfermedad de Fabry, una de las enfermedades por almacenamiento lisosomal, es un trastorno de herencia recesiva causado por la inactivación del cromosoma X. La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico congénito de los glicolípidos (glicoesfingolípidos) causado por una actividad deficiente o insuficiente de la α -galactosidasa A. Se sabe que la acumulación anormal de globotriaosilceramida (Gb3) en la pared de los vasos sanguíneos y en varias partes del cuerpo, como piel, riñones, corazón y sistema nervioso, causado por la anomalía de la α -galactosidasa A afecta significativamente la circulación sanguínea y el suministro de nutrientes. Se producen

síntomas como hipohidrosis, dolor intenso, acroparestesia, angioqueratoma, opacidad corneal, isquemia cardíaca, infarto de miocardio e insuficiencia renal y, finalmente, los riñones no funcionan correctamente, lo que provoca la muerte.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "prevención" se refiere a todas las acciones que inhiben una enfermedad mediante la administración de la proteína de fusión o una formulación líquida que incluye la misma o que inhiben o retrasan la aparición de la enfermedad mediante la administración de la formulación líquida. Como se usa en la presente memoria, 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 una formulación líquida que la incluya.

10 En una realización específica de la presente invención, la formulación líquida de la presente invención se puede usar para prevenir o tratar la enfermedad de Fabry, sin limitarse a ello.

Además, la formulación líquida de la presente invención puede ser una formulación o composición adecuada para administración subcutánea y administrada a través de una vía subcutánea, sin limitarse a ello.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "administración" se refiere a la introducción de la formulación líquida en un paciente mediante cualquier procedimiento adecuado, y las vías de administración de la formulación líquida no están particularmente limitadas, pero la formulación líquida se puede administrar por cualquier vía general siempre que la proteína de fusión α -galactosidasa A de la formulación líquida alcance un objetivo en el cuerpo vivo, por ejemplo, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, administraciones subcutáneas, administración intradérmica, administración oral, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar, o administración rectal, sin limitarse a estas.

20 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 de peso corporal de un paciente y la formulación líquida puede formularse de manera que la dosis diaria se administre adecuadamente. Sin embargo, la dosis de la proteína de fusión se determina como una dosis eficaz para el paciente teniendo en cuenta diversos factores tales como edad, peso corporal, estado de salud y sexo del paciente, gravedad de la enfermedad, dieta y tasa de excreción, así como la vía de administración y el número de administraciones de la misma y, por lo tanto, una dosis eficaz apropiada para un uso particular de la formulación líquida de la presente invención puede ser determinada por un experto en la técnica teniendo en cuenta estos factores.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para preparar la formulación líquida.

30 Específicamente, el procedimiento de preparación puede incluir mezclar una proteína de fusión de α -galactosidasa A, un tampón y un aminoácido.

La formulación líquida puede incluir además al menos uno seleccionado de un agente isotónico y un tensioactivo no iónico, sin limitarse a ello.

35 La formulación líquida y los componentes que constituyen la formulación líquida son como se describieron anteriormente.

En adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales se presentan simplemente para ilustrar la presente invención, y el ámbito de la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo 1. Cromatografía Líquida de Exclusión por Tamaño (SE-HPLC)

40 Para la cromatografía de exclusión por tamaño, primero, se diluyó una muestra mediante el uso de una fase móvil (1xPBS, Lonza) hasta una concentración de 1,0 mg/ml, seguido de filtración estéril, y se inyectaron 200 μ L de la muestra filtrada en un inserto de vial y se prepararon en un vial con tapa de rosca.

45 Posteriormente, después de conectar la fase móvil a una bomba, se cargó una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los dispositivos Waters e2695 y Waters 2489 (fabricados por Waters, Japón) mientras hacía fluir 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 redujo a 4 °C, la muestra se insertó en el muestreador. Después de inyectar 10 μ L de la muestra, se identificaron picos de detección a 214 nm mientras fluía la fase móvil durante 35 minutos.

Los resultados se analizaron mediante el uso del software Empower Pro en una computadora personal (PC).

50 Ejemplo 2. Ensayo de Desplegamiento Térmico y Agregación Térmica.

El grado de desplegamiento de la proteína se puede medir mediante la detección de longitudes de onda de emisión de triptófano expuestas en la superficie cuando la proteína se despliega a medida que aumenta la temperatura. La

fluorimetría de barrido diferencial en base a dicha intensidad de fluorescencia intrínseca se realizó mediante el uso de un dispositivo UNcle (Unchained Labs). Para analizar la estabilidad térmica de la proteína mediante el dispositivo, se midieron el desplegamiento térmico (Tm) y la agregación térmica (Tagg) de la siguiente manera.

5 Se inyectaron 8,8 µl de la muestra por duplicado en un cargador de muestras Uni (Unchained Labs) y la temperatura se elevó de 25 °C a 95 °C a una velocidad de 1 °C/min. Mientras se elevaba la temperatura, se midió la intensidad de las longitudes de onda (de 250 nm a 720 nm) emitidas a longitudes de onda de excitación de 266 nm. El análisis de datos de fluorescencia se realizó mediante el software de análisis UNcle (Unchained Labs).

10 En base al análisis, se definió como Tm una temperatura donde el pico de emisión fluorescente era máximo, y se midió una dispersión de luz estática de la proteína a 473 nm (SLS473) y una temperatura de inicio de agregación de proteína, donde se inició la agregación de la proteína, fue definida como Tagg.

Ejemplo 3. Ensayo de Actividad Biológica (actividad pNP-Gal)

15 En el ensayo de actividad de la α-galactosidasa A (α-Gal A), se utilizó 4-nitrofenil-α-D-galactopiranosido (pNP-Gal) como sustrato cromogénico. Durante la hidrólisis, el pNP-Gal se degrada en galactosa y 4-nitrofenol por la acción de la α-galactosidasa A. El 4-nitrofenol que exhibe un color amarillo claro proporciona una evidencia visual de la hidrólisis.

Un tampón utilizado para el ensayo fue el siguiente.

1) Tampón de ensayo: Ácido cítrico 20 mM, fosfato de sodio 30 mM, BSA al 0,1 % y etanol absoluto al 0,67 % (pH 4,6)

2) Solución de sustrato: 24,1 mg/ml de pNP-Gal (Sigma) en el tampón de ensayo

3) Solución de parada: Glicina 130 mM y carbonato de sodio 83 mM (pH 10,6)

20 La actividad in vitro se midió de la siguiente manera.

25 Se prepararon muestras diluidas con el tampón de ensayo (300 ng/ml y 150 ng/ml) y se preparó una solución estándar de 4-nitrofenol (Sigma) diluida con el tampón de ensayo. Se cargaron 50 µl de la muestra y la solución estándar (STD) por duplicado en cada pocillo de una placa de ensayo (Corning). La placa de ensayo y la solución de sustrato se incubaron a 37 °C durante 30 minutos para lograr el equilibrio de temperatura y luego se cargaron 50 µl de la solución de sustrato en la placa de ensayo. Después de incubar la placa de ensayo a 37 °C durante 20 minutos, se cargaron 100 µl de una solución de parada para detener la reacción, seguido de la estabilización. Luego, se analizó la absorbancia a 405 nm (lector de placas multimodo, PerkinElmer).

Ejemplo 4. Ensayo de Turbidez

30 La turbidez se analizó mediante el uso de un Lunatic (Unchained Labs). Se inyectaron 2,0 µl de la muestra en una placa Lunatic (Unchained Labs) y se midió la turbidez a 350 nm. La turbidez de un tampón placebo se restó de la turbidez de la muestra.

Los resultados del experimento se analizaron como en los siguientes ejemplos experimentales.

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

35 Una proteína de fusión de la región Fc de la inmunoglobulina y la α-galactosidasa A (en lo sucesivo, denominada proteína de fusión de la α-galactosidasa A, SEQ ID NO: 4), en la que la α-galactosidasa A de tipo nativo (SEQ ID NO: 1) está unida a una región Fc de inmunoglobulina (SEQ ID NO: 3) a través de un enlazador (SEQ ID NO: 2).

Específicamente, 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 una enzima de restricción para preparar un vector que expresa la proteína de fusión α-galactosidasa A.

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

45

Tabla 1

	Secuencia	No. Identificador secuencia:
5	Proteína	4
10	<u>MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR ALDNGLARTP TMGWLHWERF</u> MCNLDQCQEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAPQR DSEGRQLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DIDDSWKSIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDM LVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPQAKAL LQDKDVIAN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWY SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	
15	DNA	5
20	<u>ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG</u> CTTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACCTAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACCT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG	
25		
30		
35		

5	AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCAGTGTG TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC GGCGGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCCA CCAT GCCCAG CACCTGAGTTCCTGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGCCAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTC CAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT 10 GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC AAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 15 CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	
---	---	--

Se transfectaron líneas celulares CHO-S 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.

20 Específicamente, las células CHO-S se cultivaron en suspensión en un matraz Erlenmeyer de 1 L (Corning, Núm. de cat. 431147) mediante un medio de cultivo libre de suero (FreeStyle CHO Expression Medium, Thermo Fisher, Núm. de cat. 12651014) hasta que el número de células en el recipiente de cultivo alcanzó 5×10^8 , y luego las células se transformaron mediante un FreeStyle Max (Thermo Fisher, Núm. de cat. 16447-100). Es decir, después de agregar 10 ml de OptiPro SFM (Thermo Fisher, Núm. de cat. 12309-019) a cada uno de los dos tubos, se agregaron 500 μ g de ADN a un tubo y se agregaron 500 μ l de FreeStyle Max al otro tubo, seguido de mezclar las dos soluciones y la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego, el medio de cultivo se reemplazó con un nuevo medio de expresión FreeStyle CHO (Thermo Fisher, Núm. de cat. 12651014). Las células se incubaron en condiciones de 37 °C, 5 % de CO₂ y 125 rpm durante aproximadamente 96 horas para preparar la proteína de fusión α -galactosidasa A.

30 En la proteína de fusión de α -galactosidasa A preparada como se describió anteriormente, cada uno de los dos monómeros de la región Fc de inmunoglobulina que constituyen el dímero está unido a la α -galactosidasa A para formar una estructura en la que la región Fc de inmunoglobulina en la forma dimérica está fusionada a dos moléculas de α -galactosidasa A.

35 Ejemplo experimental 2: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con las condiciones de pH de la formulación líquida

Ejemplo experimental 2-1: Preparación de la formulación

Para identificar cambios estructurales de la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con el cambio de pH, se prepararon formulaciones líquidas con diferentes niveles de pH.

Tabla 2

40

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	pH
1	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	5,5
2	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	6,0

3	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	6,5
4	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	7,0
5	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	7,5
6	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	8,0

5

Ejemplo experimental 2-2: Medición de T_m y Tagg de acuerdo con cambio de pH

Los valores de T_m y Tagg de las formulaciones mostradas en la Tabla 2 se midieron mediante el dispositivo UNCLE del Ejemplo 2.

10 Como resultado, como se muestra en la Figura 1, se confirmó que una formulación líquida que tenía un pH más bajo (más cercano a pH 5,5) tenía un valor de T_m más alto, y una formulación líquida que tenía un pH más alto (más cercano a pH 8,0) tenía un valor de Tagg más alto.

Específicamente, se confirmó que los valores de T_m eran 69,8 °C, 69,7 °C, 66,6 °C, 62,3 °C, 57,8 °C y 52,6 °C, respectivamente, a pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 (Figura 2), y los valores de Tagg fueron 66,6 °C, 67,5 °C, 66,9 °C, 69,0 °C, 70,0 °C y 70,1 °C, respectivamente (Figura 3).

15 En este caso, un valor de T_m más alto indica una mayor estabilidad estructural de una proteína, y un valor de Tagg más alto indica una mayor estabilidad coloidal en la proteína.

En base a estos resultados, se confirmó que la proteína de fusión α -galactosidasa A tenía una excelente estabilidad estructural a un pH bajo cercano al pH 5,5, particularmente excelente a un pH de 5,5 a 6,5.

20 Además, en referencia a las Figuras 1 a 3, se confirmó que la variación del valor de T_m de acuerdo con el pH fue mayor que la variación del valor de Tagg, y se confirmó que el valor de T_m es más sensible al pH en comparación con el valor de Tagg.

Ejemplo experimental 2-3: Análisis SE-HPLC de acuerdo con el cambio de pH (estabilidad acelerada a temperatura ambiente)

25 Las estabildades de las formulaciones líquidas que tenían diferentes niveles de pH y preparadas en el Ejemplo experimental 2-1 anterior se compararon mediante una prueba de estabilidad acelerada a temperatura ambiente. Específicamente, las formulaciones líquidas del Ejemplo experimental 2-1 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, y todas las muestras se analizaron en el punto inicial y después de 7 días de almacenamiento a 25 °C (65 % RH).

30 Como resultado, se confirmó que la formación de agregados solubles (HMW) aumentó en relación con la proteína de fusión total a medida que aumenta el pH después de una semana de almacenamiento a temperatura ambiente (Figura 4), y también se confirmó que la formación de fragmentos aumentó (Figura 5).

Además, como resultado de identificar la recuperación de la forma nativa después de una semana, se confirmó que la recuperación de la forma nativa disminuyó a medida que aumenta el pH (Figura 6).

35 En este sentido, los agregados solubles (HMW) se encuentran en un estado en el que se retiene la actividad de la α -galactosidasa A mientras que, al tener solubilidad, algunos dominios de la α -galactosidasa A están desplegados, la forma nativa se refiere a la proteína de fusión de α -galactosidasa A preparada en el Ejemplo experimental 1 como una proteína de fusión en una forma dimérica intacta que no ha sufrido agregación o degradación, y los fragmentos se refieren a una sustancia en la que una o dos moléculas de α -galactosidasa A están separadas de la región Fc de la forma nativa, perdiendo así la estructura de la proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención. Las definiciones pueden aplicarse a continuación de la misma manera.

40

Ejemplo experimental 2-4: Análisis SE-HPLC de acuerdo con cambio de pH (estabilidad a largo plazo durante el almacenamiento en frío, 6 meses)

45 Se identificó la estabilidad a largo plazo de las formulaciones líquidas que tenían diferente pH y preparadas en el Ejemplo experimental 2-1 anterior durante el almacenamiento en frío durante 6 meses. Específicamente, las formulaciones líquidas del Ejemplo experimental 2-1 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, y todas las muestras se analizaron en el punto inicial y después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C.

Como resultado, después de 6 meses de almacenamiento en frío, se confirmó que la formación de agregados solubles (HMW) aumentó a medida que aumentó el pH (Figura 7), y también se confirmó que la formación de fragmentos aumentó (Figura 8).

Además, como resultado de la identificación de la recuperación de la forma nativa después de 6 meses de almacenamiento en frío, se confirmó que la recuperación de la forma nativa disminuyó a medida que aumentó el pH (Figura 9).

- 5 Con referencia a los Ejemplos Experimentales 2-3 y 2-4, se confirmó que la formación de agregados solubles y el desplegamiento de la proteína de fusión α -galactosidasa A aumentaron en la formulación líquida a medida que aumentaba el pH, y también se confirmó que es difícil recuperar la estructura de la proteína de fusión α -galactosidasa A. Estos resultados también indican que la proteína de fusión α -galactosidasa A tiene una excelente estabilidad estructural en la formulación líquida con un pH de 5,5 a 6,5.

Ejemplo experimental 2-5: Identificación de la actividad enzimática de la proteína de fusión α -galactosidasa A

- 10 Actividad biológica de la proteína de fusión α -galactosidasa A de la formulación líquida se identificó de la misma manera que en el Ejemplo 3. Específicamente, las formulaciones líquidas #2 (pH 6,0) y #6 (pH 8,0) del Ejemplo experimental 2-1 se analizaron mediante análisis SE-HPLC y ensayo de actividad de pNP-Gal, de modo que la formulación líquida #2 (pH 6,0) se analizó en el punto inicial de almacenamiento a 25 °C y la formulación líquida #6 (pH 8,0) se analizó después de 7 días de almacenamiento a 25 °C.

- 15 Como resultado, como se muestra en la Figura 10(a), en los resultados de SE-HPLC, un porcentaje (%) de la forma nativa de la formulación líquida a pH 6,0 en el punto inicial de almacenamiento fue del 96,7 %, y un porcentaje (%) de la forma nativa de la formulación líquida a pH 8,0 después de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente fue del 64,0 %. Además, como se muestra en la Figura 10 (b), la actividad de pNP-Gal mostró una ligera diferencia en un nivel de desviación del análisis (< 20 %). En base a esto, se confirmó que, aunque las purezas de la proteína de fusión de α -galactosidasa A eran ligeramente diferentes entre las dos formulaciones líquidas con pH 6,0 y pH 8,0, la actividad de α -galactosidasa A no era significativamente diferente.

Estos resultados indican que, aunque se forman agregados solubles a medida que se despliegan algunos dominios de la α -galactosidasa A, la actividad enzimática puede conservarse.

- 25 Ejemplo experimental 3: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con la adición de un agente isotónico a la formulación líquida

Ejemplo experimental 3-1: Preparación de la formulación

Para identificar cambios estructurales de la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con la presencia de un agente isotónico (NaCl) y su concentración, se prepararon formulaciones líquidas de la siguiente manera.

Tabla 3

30

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	pH
1	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	-	6,0
2	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	6,0
3	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 100 mM	6,0
35 4	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 200 mM	6,0
5	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 300 mM	6,0

Ejemplo experimental 3-2: Análisis SE-HPLC de formulación líquida de acuerdo con la concentración del agente isotónico (estabilidad acelerada a temperatura ambiente)

- 40 La estabilidad de diversas formulaciones líquidas que tenían diferentes concentraciones del agente isotónico preparado en el Ejemplo experimental 3-1 se identificó mediante una prueba de estabilidad acelerada a temperatura ambiente. Específicamente, las formulaciones líquidas del Ejemplo experimental 3-1 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, todas las muestras se analizaron en el punto inicial, después de 7 días y después de 14 días de almacenamiento a 25 °C.

- 45 Como resultado, después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, a medida que la concentración del agente isotónico (NaCl) aumentaba de 0 mM a 50 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM, se confirmó que las proporciones de los agregados solubles (HMW) con respecto a la proteína de fusión total disminuyeron en un 9,4 %, 9,2 %, 8,8 %, 8,8 % y 8,7 %. Además, no hubo diferencias en las proporciones de los agregados solubles entre las formulaciones líquidas a las que se añadió NaCl en una cantidad de 100 mM o más (Figura 11).

Además, después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, a medida que la concentración del agente isotónico (NaCl) aumentaba de 0 mM a 50 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM, las proporciones de los fragmentos a la proteína de fusión total disminuyeron un 7,3 %, 6,0 %, 5,5 %, 4,6 % y 4,6 %. Además, no hubo diferencias significativas en las proporciones de los fragmentos entre las formulaciones líquidas a las que se añadió NaCl en una cantidad de 200 mM o más (Figura 12).

Además, como resultado de identificar la recuperación de la forma nativa después de dos semanas de almacenamiento a temperatura ambiente, se confirmó que la recuperación de la forma nativa aumentó a medida que aumentó la concentración de NaCl, y no hubo diferencia significativa en la recuperación de la forma nativa entre las formulaciones líquidas a las que se añadió NaCl en una cantidad de 200 mM o más (Figura 13).

Ejemplo experimental 4: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A en una formulación líquida de acuerdo con la adición de aminoácidos

Ejemplo experimental 4-1: Análisis SE-HPLC en la formulación líquida de acuerdo con el tipo de estabilizador (aminoácido, azúcar y alcohol de azúcar) (estabilidad acelerada a 40 °C)

Para identificar el cambio estructural en la proteína de fusión α -galactosidasa A en la formulación líquida que incluye un estabilizador (aminoácido, azúcar o alcohol de azúcar) de acuerdo con los tipos de estabilizador, se prepararon formulaciones líquidas de la siguiente manera.

Tabla 4

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	Tensioactivo iónico	no	Estabilizador (aminoácido, azúcar, alcohol de azúcar, 1,0 % (p/v))	pH
1	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Arg	6,0
2	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Lys	6,0
3	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Ser	6,0
4	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Thr	6,0
5	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Asn	6,0
6	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Gln	6,0
7	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Gly	6,0
8	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Pro	6,0
9	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Ala	6,0
10	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Val	6,0
11	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Ile	6,0
12	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Leu	6,0

13	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Phe	6,0
14	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Sacarosa	6,0
15	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Trehalosa	6,0
16	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Sorbitol	6,0

Para identificar la estabilidad de diversas formulaciones líquidas que tienen diferentes tipos de estabilizadores, se realizó una prueba de estabilidad acelerada. Específicamente, las formulaciones líquidas de la Tabla 4 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño y todas las muestras se analizaron después de 15 horas de almacenamiento a 40 °C.

Como resultado, las proporciones de agregados solubles de las formulaciones líquidas #1 y #3 a las que se agregaron arginina y L-serina fueron del 9,7 % y 9,8 %, respectivamente, que fueron inferiores a las de las formulaciones líquidas a las que se les añadieron otros tipos de aminoácidos (Figura 14).

Ejemplo experimental 4-2: Análisis de T_m de acuerdo con la concentración de aminoácidos

Para analizar los efectos de las concentraciones de arginina y serina cuyos efectos sobre la estabilidad de la formulación líquida se confirmaron en el Ejemplo experimental 4-1, se prepararon formulaciones líquidas de la siguiente manera.

Tabla 5

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	Tensioactivo no iónico	Aminoácido	pH
1	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	-	5,5
2	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 200 mM	polisorbato 20 0,05 %	-	5,5
3	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 0,5 % (p/v)	5,5
4	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 1,0 % (p/v)	5,5
5	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 2,0 % (p/v)	5,5
6	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 4,0 % (p/v)	5,5
7	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 0,5 % (p/v)	5,5
8	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 1,0 % (p/v)	5,5
9	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 2,0 % (p/v)	5,5

10	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 4,0 % (p/v)	5,5
11	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 1,0 % (p/v) + Ser 1,0 % (p/v)	5,5
12	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Arg 2,0 % (p/v) + Ser 2,0 % (p/v)	5,5

Los valores de T_m de las formulaciones líquidas #1 a #12 de la Tabla 5 se midieron mediante un dispositivo UNCLE del Ejemplo 2.

Como resultado, mientras que el valor de T_m aumentó en proporción a la concentración de serina, no se confirmó la relevancia entre la concentración de arginina y el valor de T_m. Además, se obtuvieron valores de T_m más bajos en las formulaciones líquidas a las que se añadió arginina en concentraciones del 2,0 % y 4,0 % que en las formulaciones líquidas a las que se añadió serina en concentraciones del 2,0 % y 4,0 %. Además, se confirmó que no se obtuvo un efecto sinérgico incluso cuando se usó una mezcla de serina y arginina como estabilizador (Figura 15).

Ejemplo experimental 4-3: Análisis SE-HPLC en formulación líquida de acuerdo con la concentración de aminoácidos (estabilidad acelerada a temperatura ambiente)

La estabilidad de las formulaciones líquidas que contienen arginina y serina de acuerdo con la concentración de aminoácidos se identificó mediante una prueba de estabilidad acelerada a temperatura ambiente.

Específicamente, se midió la estabilidad acelerada a temperatura ambiente en las formulaciones líquidas que incluyen diversas concentraciones de serina y arginina como se muestra en la Tabla 5 mediante la medición de las tasas de formación de agregados solubles y la recuperación de la forma nativa. Las formulaciones líquidas de la Tabla 5 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, y todas las formulaciones líquidas se analizaron en el punto inicial, después de 1 día, después de 4 días y después de 7 días de almacenamiento a 25 °C.

Como resultado, en el caso de agregar serina, se confirmó que las tasas de formación de agregados solubles disminuyeron a medida que aumenta la concentración de serina con el transcurso del tiempo de almacenamiento, particularmente, el efecto en la inhibición de la formación de agregados solubles fue excelente incluso cuando se añadió serina en una pequeña cantidad del 0,5 % (p/v) en comparación con la del control (formulaciones líquidas #1 y #2). Además, también se confirmó que la serina exhibía efectos superiores en la inhibición de la formación de agregados solubles en la formulación líquida que incluía arginina como estabilizador. De la misma manera que en la Figura 15, la estabilidad en el caso de añadir una mezcla de arginina y serina no fue significativamente diferente de la estabilidad en el caso de agregar serina sola (Figura 16).

Además, se confirmó que la recuperación de la forma nativa aumentó en la formulación líquida a la que se añadió serina a medida que aumentaba la concentración de la serina añadida, particularmente la recuperación de la forma nativa fue superior a la del control (formulaciones líquidas #1 y #2) incluso cuando se añadió serina en una pequeña cantidad del 0,5 % (p/v). Además, se confirmó que la serina era superior para mantener la forma nativa en comparación con las formulaciones líquidas que contenían arginina como estabilizador. De la misma manera que en la Figura 15, la estabilidad en el caso de añadir una mezcla de arginina y serina no fue significativamente diferente de la estabilidad en el caso de agregar serina sola (Figura 17).

Estos resultados indican que, añadiendo un aminoácido, particularmente serina, se puede mejorar la estabilidad estructural de la proteína de fusión de α -galactosidasa A para evitar el desplegamiento de la α -galactosidasa A y se puede inhibir la formación de agregados solubles tanto como sea posible para aumentar la estabilidad de la formulación líquida.

Ejemplo experimental 5: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A de alta concentración

En base a la composición de la formulación líquida cuya estabilidad se confirmó en los ejemplos experimentales descritos anteriormente, con el fin de identificar si la estabilidad de la formulación líquida se mantiene incluso cuando la proteína de fusión α -galactosidasa A está contenida a una concentración alta, se llevó a cabo un experimento de la siguiente manera.

Ejemplo experimental 5-1: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A de alta concentración (50 mg/ml) (estabilidad acelerada a temperatura ambiente)

Se prepararon formulaciones líquidas de la siguiente manera para identificar la estabilidad de formulaciones líquidas que incluyen la proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración de 50 mg/ml.

Tabla 6

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	Tensioactivo no iónico	Aminoácido	pH
1	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	-	5,5
2	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 200 mM	polisorbato 20 0,05 %	-	5,5
3	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 0,5 % (p/v)	5,5
4	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 1,0 % (p/v)	5,5
5	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 2,0 % (p/v)	5,5
6	50 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 20 0,05 %	Ser 4,0 % (p/v)	5,5

Las formulaciones líquidas preparadas como se muestra en la Tabla 6 se analizaron mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, y todas las formulaciones líquidas se analizaron en el punto inicial, después de 1 día, después de 4 días y después de 7 días de almacenamiento a 25 °C.

Como resultado, se confirmó que a medida que aumentaba la concentración de serina, las tasas de formación de agregados solubles (HMW) en relación con la proteína de fusión total disminuían con el transcurso del tiempo de almacenamiento, en particular, el efecto sobre la inhibición de la formación de agregados solubles era superior incluso cuando se añadió serina en una pequeña cantidad de 0,5 % (p/v) en comparación con la del control (formulaciones líquidas #1 y #2) (Figura 18).

Además, se confirmó que la recuperación de la forma nativa aumentó a medida que aumentó la concentración de serina, y la mayor recuperación de la forma nativa se obtuvo incluso cuando se añadió serina en una pequeña cantidad de 0,5 % (p/v) en comparación con la del control (formulaciones líquidas #1 y #2) (Figura 19).

El efecto de la serina sobre la inhibición de la formación de agregados solubles fue superior en la formulación líquida que contiene la proteína de fusión a una concentración de 50 mg/ml en comparación con el efecto en la formulación líquida que contiene la proteína de fusión a una concentración de 10 mg/ml, lo que indica que esa serina es importante en la formulación líquida que contiene la proteína de fusión en alta concentración.

Además, como resultado del análisis del cromatograma SE-HPLC después de 7 días de almacenamiento a 25 °C, se confirmó que el progreso de agregados solubles (HWM1) a agregados de orden superior (HWM2) se inhibió significativamente a medida que la concentración de serina aumentó (Figura 20). Los agregados de orden superior son agregados que se forman a medida que avanza el desplegamiento de los agregados solubles. 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, se puede aumentar la seguridad de la formulación líquida inhibiendo la formación de agregados de orden superior mediante la adición de serina.

De manera similar, a medida que aumentó la concentración de serina, la formación de agregados de orden superior (HWM2) disminuyó significativamente en comparación con la formación de agregados solubles (HWM1) (Figura 21).

Ejemplo experimental 5-2: Identificación de la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A de alta concentración (90 mg/ml) (estabilidad durante el almacenamiento en frío de 3 semanas)

Para identificar la estabilidad de formulaciones líquidas que incluyen la proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración alta (90 mg/ml) en comparación con la del Ejemplo experimental 5-1, se prepararon formulaciones líquidas de la siguiente manera.

Tabla 7

#	Concentración de proteína de fusión	Tampón	Agente isotónico	Tensioactivo iónico	no	Aminoácido	pH
1	90 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 150 mM	polisorbato 0,05 %	20	-	6,0
2	90 mg/ml	L-histidina 20 mM	Cloruro de sodio 50 mM	polisorbato 0,05 %	20	Ser 2,0 % (p/v)	6,0

Para medir la apariencia y turbidez de las formulaciones mostradas en la Tabla 7, se utilizaron inspección visual y espectroscopia UV. El análisis se realizó en un punto inicial y después de 21 días de almacenamiento entre 2 °C y 8 °C.

Como resultado de comparar la apariencia de formulaciones líquidas que incluyen una alta concentración (90 mg/ml) de la proteína de fusión, la formulación líquida #1 que no incluye un aminoácido como estabilizador tenía una apariencia turbia, mientras que la formulación líquida #2 que contenía 2,0 % (p/v) de serina tenía una apariencia clara y transparente (Figura 22).

Además, como resultado de comparar la turbidez, la turbidez de la formulación líquida #1 que no incluye un aminoácido como estabilizador fue 49,9 y la turbidez de la formulación líquida #2 que incluye serina al 2,0 % (p/v) fue 2,8. En base a esto, se confirmó que la turbidez de la formulación líquida se reducía en el caso de incluir el aminoácido (serina) como estabilizador y, por lo tanto, se mejoraba la estabilidad de la formulación líquida (Figura 23).

Estos resultados indican que la formulación líquida de la presente invención tiene estabilidad incluso cuando la proteína de fusión α -galactosidasa A está contenida a una concentración alta.

La descripción anterior de la presente invención se proporciona con fines ilustrativos, y los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios y modificaciones sin cambiar la concepción técnica y las características esenciales de la presente invención. Por lo tanto, es evidente que las realizaciones descritas anteriormente son ilustrativas en todos los aspectos y no limitan la presente invención. Además, el ámbito 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 ámbito de la presente invención y equivalentes de la misma están incluidas en el ámbito de la presente invención.