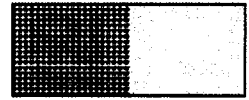


DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/KR2023/003299
International filing date:	10 March 2023 (10.03.2023)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: KR
	Number: 10-2022-0032090
	Filing date: 15 March 2022 (15.03.2022)
Date of receipt at the International Bureau:	21 March 2023 (21.03.2023)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2022-0032090
Application Number

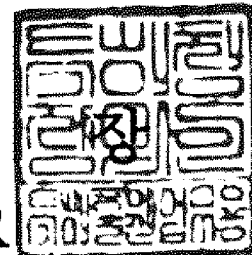
출 원 년 월 일 : 2022년 03월 15일
Filing Date MAR 15, 2022

출 원 인 : 주식회사 녹십자 외 1 명
Applicant(s) Green Cross Corporation, et al

2023 년 03 월 20 일

특 허 청

COMMISSIONER



접수	2022.03.15.
----	-------------

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	KPA220033
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	주식회사 녹십자
【특허고객번호】	1-1998-001957-5
【출원인】	
【명칭】	한미약품 주식회사
【특허고객번호】	1-2010-035663-8
【대리인】	
【명칭】	특허법인 한얼
【대리인번호】	9-2020-100061-3
【지정된 변리사】	손민
【포괄위임등록번호】	2020-009071-9
【포괄위임등록번호】	2020-009068-1
【발명의 국문명칭】	α -갈락토시다제 A의 융합단백질을 포함하는 액상 제제
【발명의 영문명칭】	Liquid Formulation comprising a fusion protein including α -galactosidase A
【발명자】	

【성명】	김미루
【성명의 영문표기】	Miroo Kim
【주민등록번호】	831218-1XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93 R&D센터
【발명자】	
【성명】	유미리
【성명의 영문표기】	Miri Yoo
【주민등록번호】	910825-2XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93 R&D센터
【발명자】	
【성명】	손재운
【성명의 영문표기】	Jae Woon Son
【주민등록번호】	780127-1XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93 R&D센터
【발명자】	
【성명】	박다의
【성명의 영문표기】	Da-eui Park
【주민등록번호】	850223-1XXXXXX

【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93 R&D센터
【발명자】	
【성명】	이신애
【성명의 영문표기】	Shin-Ae Yi
【주민등록번호】	871219-2XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 93 R&D센터
【발명자】	
【성명】	김진영
【성명의 영문표기】	Kim Jin Young
【주민등록번호】	840101-1XXXXXX
【우편번호】	18469
【주소】	경기도 화성시 동탄기흥로 550
【발명자】	
【성명】	박준섭
【성명의 영문표기】	Park Jun Sub
【주민등록번호】	870826-1XXXXXX
【우편번호】	18469
【주소】	경기도 화성시 동탄기흥로 550
【발명자】	

【성명】 장두서
【성명의 영문표기】 Jang Doo Seo
【주민등록번호】 861124-1XXXXXX
【우편번호】 18469
【주소】 경기도 화성시 동탄기흥로 550

【발명자】

【성명】 홍성희
【성명의 영문표기】 Hong Sung Hee
【주민등록번호】 790223-2XXXXXX
【우편번호】 18469
【주소】 경기도 화성시 동탄기흥로 550

【발명자】

【성명】 김상윤
【성명의 영문표기】 Kim Sang Yun
【주민등록번호】 840215-2XXXXXX
【우편번호】 18469
【주소】 경기도 화성시 동탄기흥로 550

【출원언어】 국어

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 5
【서열목록 전자파일】 미첨부

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인 한얼 (서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면 46,000 원
【가산출원료】	79 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	46,000 원
【감면사유】	중견기업(30%감면)[2]
【감면후 수수료】	32,200 원

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

α -갈락토시다제 A의 융합단백질을 포함하는 액상 제제 {Liquid Formulation comprising a fusion protein including α -galactosidase A}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 α -갈락토시다제 A의 융합단백질을 포함하는 액상 제제 및 이의 제조 방법, 이의 용도에 관한 것이다.

【0002】

【발명의 배경이 되는 기술】

【0003】 리소좀(lysosome)은 단백질, 당지질 및 콜레스테롤을 포함하는 다양한 지질 및 탄수화물이 분해되어 새로운 단백질, 막 성분 및 기타 분자의 1차 구성 성분으로 재순환되도록 기능하는 세포내 소기관으로, 이의 기능과 관련된 질환으로는 리소좀 축적 질환(Lysosomal Storage Disease; LSD)이 있다.

【0004】 리소좀 축적 질환(Lysosomal Storage Disease; LSD)은 세포의 리소좀 내 당지질 또는 다당류 노폐물을 분해시키는 효소를 코딩하는 유전자의 결함에 기인한 질환으로, 리소좀 축적 질환이 발병한 개체의 세포 및 조직에서는 리소좀 효소의 생물학적 활성이 크게 감소하거나 거의 없다. 이렇게 분해 효소가 결핍되었을 때 과량의 물질이 분해되지 않고 축적되어 결국 세포의 기능에도 문제를 일으키게 되는 것이다.

【0005】 리소좀 축적 질환 중 하나로 알려진 파브리병(Fabry disease)은 리소좀에 존재하는 가수분해 효소인 알파 갈락토시다제 A(α -galactosidase A)의

효소 활성 결핍 또는 부족에 의한 결과로 나타나는 당지질(glycosphingolipid)의 선천성 대사이상의 일종이다. α -갈락토시다제 A 결핍증의 대표적인 질환인 파브리 병은 X 염색체 연관 질환으로, 전형적인 파브리 질환 대상체는 통상 1% 미만의 α -갈락토시다제 A 활성을 가지며, 말단에서의 극심한 통증(말단지각이상증), 소한증, 각막 및 수정체 변화, 피부 병변(혈관각화증), 신부전, 심혈관계 질환, 폐부전, 신경계 증상 및 뇌졸중을 포함한 광범위한 증상을 보인다.

【0006】 파브리병은 신체의 대부분의 조직에서 글로보트리아실세라마이드 (globotriasylceramide; Gb3)의 점진적인 퇴적을 초래한다. 상기 Gb3의 퇴적은 주로 혈관 내피에서 발견된다. 이러한 Gb3의 점진적인 혈관 내피 축적은 신장, 심장 또는 뇌를 포함하는 기관에서 허혈 및 경색으로 이어진다.

【0007】

【0008】 리소좀 축적 질환을 치료하기 위한 방법으로 대표적으로는 효소-대체 요법 (ERT: enzyme-replacement therapy)이 있으며 관련된 많은 연구가 진행되고 있다 (Frances M. Platt et al., J Cell Biol. 2012 Nov 26;199(5):723-34). 특히 리소좀 축적 질환은 특정 효소의 유전적 결함으로 인해 생기는 병이므로, 결함이 있는 효소의 보충치료가 필수적이다. 효소 보충 치료는 리소좀 축적 질환에서 표준이 되는 치료로서, 부족한 효소를 보충하는 것을 통해 기존의 증상이 완화되거나 질환의 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있으며, 이에, α -갈락토시다제 A 결핍증의 예방 및 치료를 위한, α -갈락토시다제 A를 포함하는 다양한 제형의 연구가 이루어지고 있다.

【0009】그러나, 제제의 경우, 유효 성분(예를 들어, 단백질 약물)의 구조, 물리화학적 성질, 용량 등에 따라 안정성을 나타내는 제제의 조성이 크게 변화하기 때문에 유효 성분에 적합한 특정한 조성을 개발하는 것이 필수적으로 요구되며, 현 시점에서 α -갈락토시다제 A를 포함하는 제제의 개발은 미비한 실정이다. 특히, 고농도로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하는 액상 제제의 경우, 단백질 침전 등이 문제되어 보관 안정성이 크게 낮아지기 때문에 기존의 액상 제제는 모두 1mg/ml 이하로 포함한다. 그러나, 약효의 증대를 위해 고농도로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하면서도 안정성이 높은 제제를 개발하는 것이 필요하다.

【0010】

【0011】아직 α -갈락토시다제 A의 효소 활성을 오래 유지하면서 장기간 동안 보관할 수 있는 안정한 액상 제제의 개발이 미비하고, 더 나아가 고농도로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하는 액상 제제는 개발되지 않았기 때문에, 새로운 조성의 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하는 액상 제제의 개발이 여전히 요구된다.

【0012】

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0013】본 발명의 하나의 목적은 α -갈락토시다제 A의 용합 단백질을 포함하는 액상 제제를 제공하는 것이다.

【0014】본 발명의 다른 목적은 상기 액상 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【0015】

【과제의 해결수단】

【0016】 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 액상 제제이다.

【0017】 하나의 구체예에서, 상기 액상 제제는 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질; 완충 용액; 등장화제; 및 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0018】 다른 하나의 구체예에서, 상기 액상 제제는 10 내지 90 mg/ml 의 융합 단백질; 상기 액상 제제의 pH를 5.0 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 완충 용액; 및 0.1 내지 4.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0019】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 10 내지 90 mg/ml 의 융합 단백질; 상기 액상 제제의 pH를 5.5 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 완충 용액; 및 0.5 내지 4.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0020】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질; 10 내지 50 mM 히스티딘; 및 1.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0021】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질; 10 내지 50 mM 히스티딘; 50 내지 200 mM 염화나트륨; 및 1.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0022】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 완충 용액은 히스티딘과 그 염, 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 인산과 그 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0023】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 등장화제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0024】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 등장화제는 염화나트륨인 것을 특징으로 한다.

【0025】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 등장화제는 50 내지 200 mM으로 포함되는 것을 특징으로 한다.

【0026】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 아미노산은 아르기닌, 세린, 트레오닌, 글루타민, 글리신, 알라닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

【0027】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 0.005 내지 0.1%(w/v) 의 농도로 비이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0028】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머 188, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

【0029】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 α -갈락토시다제 A는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0030】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0031】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0032】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.

【0033】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.

【0034】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 융합 단백질은 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 이량체를 형성한 면역글로불린 Fc 영역의 각 단량체에 연결된 것을 특징으로 한다.

【0035】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 파브리병의 예방 또는 치료를 위한 것을 특징으로 한다.

【0036】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 액상 제제로서, 상기 액상 제제는 피하 투여의 경로로 투여되는 것을 특징으로 한다.

【0037】본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제를 제조하는 방법이다.

【0038】하나의 구체예로서, 상기 액상 제제의 제조 방법은 α -갈락토시다제 A의 융합 단백질; 완충 용액; 및 아미노산을 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0039】 다른 구체예로서, 상기 액상 제제의 제조 방법은 등장화제, 비이온성 계면활성제, 보존제, 또는 이들의 조합을 추가로 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0040】

【발명의 효과】

【0041】 본 발명에 따른 액상 제제는 α -갈락토시다제 A의 융합 단백질에 구조적 안정성을 부여하는 조성을 포함하여 보관 안정성을 가질 뿐만 아니라, 고농도 융합 단백질을 포함하더라도 우수한 안정성을 갖는다.

【0042】

【도면의 간단한 설명】

【0043】 도 1은 pH 변화에 따른 T_m 및 Tagg 값을 측정된 결과를 나타내는 도이다.

도 2는 도 1에서 확인된 T_m 값을 정리하여 나타낸 도이다.

도 3은 도 1에서 확인된 Tagg 값을 정리하여 나타낸 도이다.

도 4는 실온 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 용해성 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 실온 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 단편의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 6는 실온 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 천연형 회수율을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 7는 냉장 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 용해성 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8는 냉장 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 단편의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 냉장 보관 시 액상 제제의 pH 변화에 따른 천연형 회수율을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 10은 pH 6.0 및 pH 8.0 액상 제제의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 SE-HPLC (도 10의 (a)) 및 생물학적 활성 분석(도 10의 (b)) 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 액상 제제의 등장화제 농도에 따른 용해성 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 액상 제제의 등장화제 농도에 따른 단편의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 액상 제제의 등장화제 농도에 따른 천연형 회수율을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 14는 액상 제제의 아미노산의 종류에 따른 가속안정성을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 15는 아미노산의 농도 변화에 따른 T_m 값을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 액상 제제의 아미노산의 농도 변화에 따른 용해성 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 액상 제제의 아미노산의 농도 변화에 따른 천연형 회수율을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 18은 고농도(50mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 아미노산의 농도 변화에 따른 용해성 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 고농도(50mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 아미노산의 농도 변화에 따른 천연형 회수율을 SE-HPLC 분석으로 확인한 도이다.

도 20은 고농도(50mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 SE-HPLC 크로마토그램을 나타낸 도이다.

도 21은 고농도(50mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제에서 HMW1 및 HMW2 응집체의 SE-HPLC 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 22는 고농도(90mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 성상을 확인한 도이다.

도 23은 고농도(90mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 탁도를 확인한 도이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0044】 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다.

【0045】 한편, 본원에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

【0046】 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

【0047】 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(2-아미노이소부티르산, 2-aminoisobutyric acid), Sar(N-methylglycine), 알파-메틸-글루탐산(α -methyl-glutamic acid) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다.

【0048】 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

【0049】 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

【0050】 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

【0051】 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

【0052】 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

【0053】 류신 Leu, L 리신 Lys, K

【0054】 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

【0055】 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

【0056】 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

【0057】 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

【0058】

【0059】 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 융합 단백질을 포함하는 액상 제제를 제공한다.

【0060】 구체적으로, 본 발명은 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 융합 단백질을 약리학적 유효량으로 포함하고, 완충 용액, 및 아미노산을 포함하는 액상 제제에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 액상 제제는 등장화제, 비이온성 계면활성제, 보존제, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0061】

【0062】 본 발명에서 용어 "액상 제제"는 의약품의 형태를 액상으로 제제화한 약물을 의미하며, 이는 액상의 내용 제제 및 외용 제제를 모두 포함한다.

【0063】 본 발명의 액상 제제는 약리 효과를 나타내는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질이 액상으로 제제화될 때 이를 일정 기간 동안 안정하게 유지 및/또는 저장시킬 수 있는 물질을 포함한다. 상기 액상 제제의 약리효과를 나타내는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질 이외에 포함되는 성분은 안정화제와 혼용될 수 있다. 본 발명에서 용어, "안정화제"란 제제에서 유효성분 등의 구성 성분을 일정 기간 동안 안정하게 유지시키는 물질을 말한다.

【0064】

【0065】 본 발명의 액상 제제는 장기간 보관에도 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 약리 효과가 오래 유지될 수 있도록 융합 단백질의 구조를 안정화할 수 있는 안정화제의 조성을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0066】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 형태로, 다양한 외부 요인 (pH, 온도, 삼투압, 안정화제 유무 등)에 의해 단백질의 구조가 변형되는 풀림(unfolding) 현상이 발생하고, 이로 인해 효소 활성의 상실을 유발하며, α -갈락토시다제 A를 포함하는 제제의 약리 효과를 현저히 낮출 수 있다. 특히, α -갈락토시다제 A는 pH 환경에 민감하게 반응하여 α -갈락토시다제 A를 이루는 두 개 도메인 중 하나의 도메인이 먼저 풀리고(용해성 응집체 형성), 점차적으로 α -갈락토시다제 A의 다른 도메인과 면역글로불린 Fc 영역이 순차적으로 풀려 고차 응집체를 거쳐 최종적으로 면역글로불린 Fc 영역의 CH2 및 CH3까지 풀리게 되면 (불용성 응집체 형성), 육안으로 확인할 수 있을 정도의 침전이 발생하게 된다. 액상 제제의 보관 과정에서 발생하는 스트레스로 인해 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조를 유지하지 못하고 용해성 응집체나 고차 응집체가 형성될 경우 면역원성의 위험이 높아져 제제의 안전성이 문제 된다.

【0067】 본 발명자들은 액상 제제의 안정성을 위해서는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 풀림을 방지하는 조성을 포함하는 것이 중요한 것을 확인하였을 뿐만 아니라, α -갈락토시다제 A가 풀려 용해성 응집체가 형성되더라도 불용성 응집체가 형성되기 전까지는 활성 부위(active site)의 구조가 유지되어 α -갈락토시다제 A의 효소 활성이 유지되는 것을 확인함으로써, α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조적 안정성을 최대한 유지하고, 더 나아가 형성된 용해성 응집체에서 단백질 풀림 현상이 더 진행되어 불용성 응집체를 형성하는 것을 방지하기 위해 pH 조절, 및 안정화제(아미노산 등)의 첨가가 중요한 것을 규명하고, 본 발명을 완성하였다.

본 발명의 액상 제제는 장기간 보관하더라도 융합 단백질의 구조 및 활성을 유지할 수 있으며, 면역원성이 낮아 투약 안전성도 우수하다.

【0068】

【0069】 본 발명에 따른 액상 제제의 구체적인 예시로서, α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질; 완충 용액; 및 아미노산을 포함하는 것일 수 있고, 보다 구체적인 예시로는, 10 내지 90 mg/ml 의 융합 단백질; 완충 용액; 및 0.1 내지 4.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 액상 제제로서, pH가 5.0 내지 6.5인 액상 제제를 들 수 있다.

【0070】 또한, 다른 예시로서, 10 내지 90 mg/ml 의 융합 단백질; 완충 용액; 및 0.5 내지 4.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 액상 제제로서, pH가 5.5 내지 6.5인 액상 제제를 들 수 있다.

【0071】 또 다른 예시로서, 10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질; 10 내지 50 mM 히스티딘; 및 1.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는 액상 제제를 들 수 있으나, 본 발명의 액상 제제는 상기 예시에 국한되지 않는다.

【0072】

【0073】 본 발명의 액상 제제는 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 약 1 내지 150 mg/ml, 약 1 내지 130 mg/ml, 약 1 내지 100 mg/ml, 약 5 내지 100 mg/ml, 약 5 내지 90 mg/ml, 약 10 내지 90 mg/ml, 약 10 내지 50 mg/ml, 또는 약 50 내지 90 mg/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0074】 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 , ± 0.01 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

【0075】 일반적으로 제제 내에 포함되는 단백질의 농도가 높을수록 제제의 안정성을 유지하기 어렵고 단백질 침전 등이 발생하는 문제가 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 발명의 액상 제제는 고농도로 용합 단백질을 포함하더라도 용합 단백질의 구조를 유지할 수 있으며 침전이 발생하지 않는 조성을 가지므로, 고농도, 예를 들어 약 10 mg/ml 이상, 약 15 mg/ml 이상, 약 35 mg/ml 이상, 약 50 mg/ml, 또는 약 90 mg/ml 이상의 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 유효 성분으로 포함할 수 있다.

【0076】

【0077】 본 발명의 액상 제제에 포함되는 일 구성요소인 완충 용액(buffer)은 α -갈락토시다제 A 용합 단백질이 안정해지도록 액상 제제의 pH를 유지시키기 위한 용액이다. 본 발명의 액상 제제는 완충 용액을 액상 제제의 용매로 포함할 수 있으며, 목적하는 안정화 대상 물질인 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 안정화시킬 수 있는 pH를 유지시킬 수 있는 한, 본 발명의 완충 용액으로 제한 없이 이용될 수 있다.

【0078】 본 발명의 실험예에서는 액상 제제의 pH 값에 의해 용합 단백질의 구조가 변화하는 것을 확인하였으며, 구체적으로는 pH 5.5 내지 6.5의 범위에서 용합 단백질의 구조적 안정성이 가장 우수한 것을 확인하였다. 또한, 용합 단백질을 구성하는 요소 중, α -갈락토시다제 A가 면역글로불린 Fc 영역에 비해 pH에 의한

영향을 크게 받아 pH 값 변경에 따라 폴림(unfolding)이 발생하는 것을 확인하였다. 이에, 액상 제제의 pH를 적정 수준으로 유지하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조적 안정성을 도모하는 것이 중요하다.

【0079】 상기 완충 용액은 인산과 그의 짝염인 알칼리 염(예를 들어, 인산 염: 인산나트륨, 인산칼륨 또는 이들의 수소 또는 이수소 염), 구연산과 그의 염(예를 들어, 구연산 나트륨), 아세트산과 그 염(예를 들어, 아세트산나트륨), 히스티딘과 그 염을 포함하는 것일 수 있고, 이들의 혼합물도 완충 용액으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 완충 용액은 구연산 완충용액(예, 구연산 나트륨 완충용액), 아세트산 완충용액(예, 아세트산 나트륨 완충용액), 인산 완충용액(예, 인산 나트륨 완충용액), 히스티딘 완충 용액, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 완충 용액 또는 액상 제제 내의 완충물질(구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 또는 이들의 조합)은 목표로 하는 액상 제제의 pH를 유지하는 데 충분한 분량의 농도로 포함될 수 있다.

【0080】 상기 액상 제제의 pH는 약 5.0 내지 8.0, 예컨대 약 pH 5.0 내지 7.5, 약 pH 5.0 내지 7.0, 약 pH 5.0 내지 6.5, 약 pH 5.0 내지 6.0, 약 pH 5.5 내지 8.0, 약 pH 5.5 내지 7.5, 약 pH 5.5 내지 7.0, 약 pH 5.5 내지 6.5, 약 pH 5.5 내지 6.3, 약 pH 5.5 내지 6.2, 약 pH 5.5 내지 6.1, 약 pH 5.5 내지 6.0, 약 pH 5.5 내지 5.9, 약 pH 5.5 내지 5.8, 약 pH 5.5 내지 5.7, 약 pH 5.5 내지 5.6, 약 pH 6.0 내지 6.5, 또는 pH 약 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, 또는 6.5일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0081】 상기 목표하는 pH가 될 수 있도록 완충 용액은 인산, 구연산, 아세트산, 히스티딘, 또는 이들의 염, 또는 이들의 혼합물을 약 1 mM 내지 약 200 mM, 약 5 mM 내지 약 100 mM, 약 5 mM 내지 약 80 mM, 약 5 mM 내지 약 40 mM, 약 8 mM 내지 약 40 mM, 약 5 mM 내지 약 30 mM, 또는 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 10 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 25 mM, 약 15 mM 내지 약 25 mM, 또는 약 20 mM으로 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0082】

【0083】 하나의 구체예로, 상기 완충 용액은 20 mM 히스티딘을 포함하고 약 pH 5.5 내지 6.5일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0084】

【0085】 본 발명의 액상 제제에 포함되는 안정화제의 다른 종류인 아미노산은 액상 제제 내 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 용해성 응집체의 상태를 유지시킬 수 있다. 상기 용해성 응집체의 상태에서 용합 단백질의 구조 변형(폴림)이 더 진행되어 불용성 응집체가 형성되면 침전, 효소 활성 상실 등의 문제가 발생하게 된다.

【0086】 본 발명의 실험예에서는 아미노산의 첨가로, α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 폴림이 진행되어 고차 응집체(higer-order aggregate)로 변화하는 것을 방지하여 불용성 응집체의 형성을 방지할 수 있는 것을 확인하였다. 또한, 고농도의 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하는 액상 제제에서 고차 응집체 형성을 방지하여 단백질 침전을 방지하고 보관 시 안정성을 높이는데 큰 영향을 미치는 것을 확인하였다. 용해성 응집체나 고차 응집체의 생성으로 인해 제제의 체내 투여

시 면역원성을 유발할 수 있으므로, 용해성 응집체나 고차 응집체의 형성을 저해하는 것이 요구된다.

【0087】 본 발명의 액상 제제에 포함되는 아미노산은 아르기닌, 라이신, 세린, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 글라이신, 프롤린, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌 또는 이들의 조합일 수 있고, 구체적으로, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 글루타민, 글리신, 알라닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 예로, 상기 아미노산은 세린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0088】 본 발명의 액상 제제에는 아미노산이 약 0.1 내지 5.0 %(w/v), 약 0.5 내지 5.0 %(w/v), 약 0.5 내지 4.0 %(w/v), 약 1.0 내지 5.0 %(w/v), 약 1.0 내지 4.0 %(w/v), 약 2.0 내지 5.0 %(w/v), 약 2.5 내지 5 %(w/v), 약 3.0 내지 5 %(w/v), 약 3.5 내지 5 %(w/v), 약 2.0 내지 4.5 %(w/v), 약 2.0 내지 4.0 %(w/v), 또는 약 1.0 %(w/v), 약 2.0 %(w/v), 약 3.0 %(w/v), 약 4.0 %(w/v), 약 5.0 %(w/v)로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0089】

【0090】 본 발명에 따른 액상 제제는 등장화제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 등장화제는 액상 제제의 삼투압 조정을 위해 첨가되는 물질로, 적정 삼투압을 유지하면서 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 안정화하는데 기여할 수 있는 한, 등장화제로 제한 없이 본 발명의 액상 제제에 포함될 수 있다.

【0091】 상기 등장화제는 수용성 무기염을 포함할 수 있으며, 구체적으로, 본 발명의 액상 제제는 염화나트륨을 등장화제로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0092】 본 발명의 실험예에서는 등장화제가 본 발명의 액상 제제에서 용해성 응집체 형성을 저해하고 융합 단백질의 천연형을 유지하는 것을 보조할 수 있는 것을 확인하였다.

【0093】 본 발명에 사용되는 염화나트륨의 농도는 약 0 내지 300mM, 구체적으로, 약 0.1mM 내지 300 mM일 수 있고, 약 5mM 내지 300 mM, 약 5mM 내지 200 mM, 약 5mM 내지 150 mM, 약 5mM 내지 100 mM, 약 10mM 내지 200 mM, 약 10mM 내지 150 mM, 약 10mM 내지 100 mM, 약 30mM 내지 200 mM, 약 30mM 내지 150 mM, 약 30mM 내지 100 mM, 약 50mM 내지 200 mM, 약 50mM 내지 150 mM, 약 50mM 내지 100 mM일 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 제제에 포함된 성분들은 종류 및 양에 따라 각각의 혼합물이 모두 포함된 용액 제형이 등장액이 되도록 적절한 함량으로 조절될 수 있다.

【0094】

【0095】 본 발명에 따른 액상 제제는 비이온성 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 비이온성 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 소수성 표면에 단백질이 흡착되거나 응집되는 것을 방지하여 줄 수 있다.

【0096】 본 발명에 사용될 수 있는 비이온성 계면활성제의 구체적인 예로는 폴리소르베이트류(예컨대, 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노라우레이트), 폴리소르베이트 40(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노팔미테이트),

폴리소르베이트 60(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노스테아레이트), 폴리소르베이트 80(폴리옥시에틸렌(20) 소르비탄 모노올레이트); 상기 폴리옥시에틸렌 뒤의 수치(20)은 옥시에틸렌기($-(CH_2CH_2O)-$)의 총 개수를 의미함), 폴록사머(PEO-PP0-PEO 공중합체; PEO: poly(ethylene oxide), PP0: poly(propylene oxide)), 폴리에틸렌-폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 화합물(예컨대, 폴리옥시에틸렌-스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(알킬: C1-C30), 폴리옥시에틸렌 모노알릴 에테르, 알킬페닐 폴리옥시에틸렌 코폴리머(알킬: C1-C30) 등), 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulphate, SDS) 등일 수 있으며, 또는 폴리소르베이트 또는 폴록사머를 들 수 있으며, 이들이 하나 또는 둘 이상의 조합 형태로도 사용될 수 있다.

【0097】 구체적으로, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머 188, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 또는 폴리소르베이트 80일 수 있으며, 이들이 조합되어 사용될 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0098】 본 발명에서 상기 비이온성 계면활성제는 본 발명의 액상 제제에 약 0.2%(w/v) 이하의 농도, 예컨대 약 0.001 내지 약 0.2%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.001 내지 약 0.08%(w/v), 약 0.002 내지 약 0.08%(w/v), 약 0.005 내지 약 0.05%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v), 또는 약 0.05%(w/v)로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0099】

【0100】 본 발명에 따른 액상 제제는 당(sugar)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 당은 단당류, 이당류, 다당류, 올리고당류 등을 말하며, 액상 제제 내 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성을 증대시킬 수 있다. 구체적인 예로는 만노스,

글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 푸코스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 텍스트란, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 하나의 구체예로 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 상기 당은 수크로스 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0101】

【0102】 본 발명에 따른 액상 제제는 당알코올을 추가로 포함할 수 있고, 상기 당알코올은 다수의 수산기를 포함하는 물질을 말하며, 당의 알데히드기 및/또는 케톤기 등이 알코올기로 치환된 물질을 포함하며, 다중 수산기를 포함하는 당류 등도 포함한다. 상기 당 또는 당알코올은 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 안정성을 증대시킬 수 있다. 예컨대, 상기 당알코올은 만니톨 및 소르비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0103】 상기 당알코올, 당, 또는 이들의 조합은 액상 제제의 전체 용액 대비 약 0.5 내지 20%(w/v), 약 0.5 내지 15%(w/v), 약 0.5 내지 10%(w/v), 약 0.5 내지 8 %(w/v), 약 0.5 내지 5 %(w/v), 약 0.5 내지 4 %(w/v), 약 1 내지 20%(w/v), 약 1 내지 15%(w/v), 약 1 내지 10%(w/v), 약 1 내지 8%(w/v), 약 1 내지 6%(w/v), 약 1 내지 5%(w/v), 또는 약 0.0 %(w/v), 약 1.0 %(w/v), 약 3.0 %(w/v), 약 4.0 %(w/v), 약 5.0 %(w/v), 또는 약 8.0 %(w/v)의 농도로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0104】

【0105】 본 발명에 따른 액상 제제는 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보존제는 제제에서 박테리아, 곰팡이의 작용을 실질적으로 감소시키는 물질로서, 다회 투여용 제제의 생산을 용이하게 하기 위하여 제제에 포함되는 화합물이다. 잠재적 보존제의 실례로서, 옥타데실디메틸-벤질 암모늄 클로라이드(octadecyl dimethyl-benzyl ammonium chloride), 헥사메소늄 클로라이드(hexamethonium chloride), 벤잘코늄 클로라이드(benzalkonium chloride)(알킬기가 장쇄 화합물인 알킬 벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물), 벤제소늄 클로라이드(benzethonium chloride) 등이 있으며, 이와 다른 유형의 보존제로는 방향족 알코올, 예를 들면, 페놀, 부틸, 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면, 메틸이나 프로필 파라벤; 카테콜(catechol), 레조르시놀(resorcinol), 시클로헥산올(cyclohexanol), 3-펜탄올(3-pentanol), m-크레졸(m-cresol) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 보존제의 농도는 0.001내지 1.0%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0106】

【0107】 한편, 본 발명의 액상 제제에는 상기 설명한 완충 용액, 등장화제, 아미노산, 비이온성 계면활성제, 및 보존제 외에 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0108】

【0109】 본 발명에 따른 액상 제제의 구체적인 예로, 10 내지 90 mg/ml 의 융합 단백질; 10 내지 50 mM 히스티딘; 및 1.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는 액상 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0110】 본 발명에 따른 액상 제제의 다른 구체적인 예로, 10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질; 10 내지 30 mM 히스티딘; 및 2.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는, pH 5.5 내지 6.0의 액상 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0111】 본 발명에 따른 액상 제제의 다른 구체적인 예로, 10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질; 10 내지 30 mM 히스티딘; 50 내지 150 mM 염화나트륨; 및 2.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는, pH 5.5 내지 6.0의 액상 제제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0112】

【0113】 또한, 본 발명에 따른 액상 제제는 추가로 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 등을 포함할 수 있고, 이러한 담체, 부형제는 비자연적으로 존재하는 것일 수 있다.

【0114】

【0115】 한편, 하기에서는 본 발명의 액상 제제에 포함되는 유효성분인 α -갈락토시다제 A 융합 단백질에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

【0116】

【0117】 본 발명의 액상 제제에 포함되는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질을 의미하고, 상기 융합 단백질은 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 링커를 통해 이량체의 면역글로불린 Fc 영역에 연결된 형태를 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 이량체를 형성한 면역글로불린 Fc 영역의 각 단량체에 링커를 통해 공유 결합으로 연결된 것일 수 있다. 또한, 상기 두 분자의 α -갈락토시다제 A는

서로 비공유 결합을 통해 이량체를 형성할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A에 면역글로불린 Fc 영역이 융합되어 α -갈락토시다제 A의 안정성이 높아져 체내에서 약리 효과를 오래 발휘할 수 있다. 본 발명의 액상 제제는 이와 같은 융합 단백질에 추가로 안정화제를 포함하여 우수한 안정성을 가져 장기간 보관에도 약리 효과를 잃지 않는 것일 수 있다.

【0118】 구체적으로, 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 단량체 두 개가 이량체를 형성한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 융합 단백질에 대해서는 WO 2019/009684의 명세서가 참조 문헌으로서 포함된다.

【0119】

【0120】 본 발명에서 " α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질", " α -갈락토시다제 A 융합 단백질" 및 "융합 단백질"은 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

【0121】 본 발명의 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A가 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태로 형질전환체에서 발현되어 면역글로불린 Fc영역이 이량체(dimer)를 형성할 때, α -갈락토시다제 A도 비공유 결합을 통해 이량체를 형성하는 것일 수 있다.

【0122】

【0123】 본 발명의 α -갈락토시다제 A(α -galactosidase A, α -Gal A, GLA)는 비장, 뇌, 간 등의 리소솜에 존재하는 효소로서, 당지질과 당단백에서 끝알과 갈락토실 (galactosyl) 모이어티를 가수분해하는 효소로서, 호모다이머릭 (homodimeric) 당단백이다. 특히, 리소솜 축적 질환인 파브리병(Fabry disease)와 연관된 것으로 알려져 있다. 상기 α -갈락토시다제 A는 두 개 도메인(TIM barrel domain 및 β -sheet containing immunoglobulin-like domain)으로 구성된 이량체 구조로서(Journal of Biological chemistry, Vol. 287, No. 34, 2012; Lieberman et al. Biochemistry, Vol. 48, No. 22, 2009), pH 환경이 높아질수록 풀림 현상이 일어나기 때문에 이를 포함하는 액상 제제는 적절한 수준의 pH를 유지할 것이 요구된다. 특히, 한 도메인이 풀린 용해성 응집체 상태에서는 활성 부위(active site)가 유지되지만 풀림이 더 진행되어 불용성 응집체가 되면 활성을 상실하기 때문에 용해성 응집체 상태를 유지하여 효소 활성을 발휘할 수 있도록 안정화제를 포함할 것이 요구된다. 더 나아가, 용해성 응집체는 면역원성의 위험을 높여 체내 투여시 면역반응을 유발할 위험이 크다. 이에, 제제의 보관 과정에서 용해성 응집체가 형성되는 것을 최대한 방지할 수 있도록 제제의 안정성을 높여 투여 시의 안전성을 확보하는 것이 중요하다.

【0124】 본 발명에서, 상기 α -갈락토시다제 A는 천연형이거나 재조합 형태일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0125】 또한, 상기 α -갈락토시다제 A는 천연형의 단편, 혹은 일부 아미노산의 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification)

및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난, 아날로그 (analog) 역시 천연형 효소와 동등한 활성을 갖는 한, 본 발명에 제한 없이 포함된다.

【0126】 또한, 상기 α -갈락토시다제 A는 서열번호 1의 아미노산 서열과 60%, 70%, 80% 이상, 구체적으로 90% 이상, 보다 구체적으로 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 재조합 기술에 의해 미생물로부터 수득하거나, 상업적으로 이용가능 한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0127】 본 발명의 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 아미노산 서열 및 야생형 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행한다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

【0128】 상기 α -갈락토시다제 A 또는 이의 유도체의 서열 및 이를 코딩하는 염기서열의 정보는 NCBI 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

【0129】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A가 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태로 형질전환체에서 발현시켜 제조할 수 있다.

【0130】

【0131】 상기 링커는 펩타이드 링커로서, 본 발명의 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A와 면역글로불린 Fc 영역이 펩타이드 링커를 통해 융합된 것일 수 있다.

상기 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0132】

【0133】 상기 펩타이드 링커는 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으며, 당업계에 알려진 임의의 펩타이드 링커, 그 예로 [GS]_x 링커, [GGGS]_x 링커 및 [GGGGS]_x 링커 등을 포함하며, 여기서 x는 1 이상의 자연수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 이상)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 본 발명의 펩타이드 링커는 10 내지 50개, 보다 구체적으로, 20 내지 40개 아미노산 서열로 구성될 수 있으며, 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 것일 수 있다.

【0134】

【0135】 본 발명의 목적상 α -갈락토시다제 A의 활성을 유지하면서 면역글로불린 Fc 영역을 연결할 수 있는 한, 펩타이드 링커가 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역에 융합되는 위치는 제한되지 않는다. 구체적으로, α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역의 양 말단, 보다 구체적으로, α -갈락토시다제 A의 C-말단, 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0136】 본 발명의 용어, "N-말단" 또는 "C-말단" 은, 각각 단백질의 아미노 말단 및 카르복실 말단을 의미하는 것으로, 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, N-말단 또는 C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 N-말단 또는 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 10 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

【0137】 본 발명에서, 상기 펩타이드 링커는 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 형성하는 이량체 면역글로불린 Fc 영역에 각각 연결되는 것일 수 있으며, 각 면역글로불린 Fc 영역에 연결된 링커는 각각 한 분자의 α -갈락토시다제 A에 독립적으로 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0138】

【0139】 본 발명의 효소 융합단백질의 일 구성 요소(moiety)인 면역글로불린 Fc 영역은 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성한 것일 수 있다.

【0140】 본 발명의 용어, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 본 발명의 목적상 이와 같은 Fc 영역은 변이된 힌지영역을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은, 천연형 면역글로불린 Fc 영역에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0141】 상기 면역글로불린 Fc 영역은 약물을 제조하는데 있어서 캐리어로 이용되는 물질로, 단백질을 안정화하고 신장에서 제거되는 것을 방지하기 위하여, 최근에는 면역글로불린 Fc 영역을 이용한 융합단백질 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역글로불린은 혈액의 주요 구성성분으로 IgG, IgM, IgA, IgD, IgE와 같이 5가지 종류가 있는데 융합단백질 연구에 자주 사용되는 종류는 IgG로 이는 IgG1~4의 4가지 subtype으로 분류된다.

【0142】 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 영역을 포함할 수 있으며, 상기 힌지 영역으로 인하여 단량체인 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.

【0143】 구체적으로, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 및 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합일 수 있다. 그러나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 영역, CH2 도메인 및 CH3 도메인으로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0144】

【0145】 본 발명의 용어, "힌지 서열" 은 중쇄에 위치하여 이황화결합(interdisulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미하고, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역 힌지 서열의 존재로 면역글로불린 Fc 사슬 두 분자가 이량체를 형성한 형태일 수 있다.

【0146】 구체적으로, 상기 힌지 영역은 힌지 영역의 일부가 결실되어, 하나의 시스테인 (Cys) 잔기만을 포함하도록 변이된 것일 수 있고, 사슬 교환 (chain exchange)에 관여하는 세린 (Ser) 잔기를 프롤린 (Pro) 잔기로 치환된 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 힌지 서열의 2번째 세린 잔기가 프롤린 잔기로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0147】

【0148】 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 치환체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다.

【0149】 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.

【0150】 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(anti body dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면

역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제W0 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

【0151】 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에 서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 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, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황산화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.

【0152】 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.

【0153】 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)2로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion

chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 재조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

【0154】 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.

【0155】 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.

【0156】

【0157】 한편, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

【0158】 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다.

더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0159】

【0160】 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.

【0161】

【0162】 본 발명의 액상 제제에 포함되는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 면역글로불린 Fc 영역은 이량체 형태(dimeric form)일 수 있으며, 구체적으로는 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조일 수 있다. 더 구체적으로는, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서 서로 연결되어 있는 구

조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 리신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 이량체 형태의 하나의 Fc 영역이 두 개의 링커를 통해 두 분자의 α -갈락토시다제 A에 공유 결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0163】

【0164】 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 α -갈락토시다제 A 또는 융합 단백질에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 α -갈락토시다제 A 또는 융합 단백질은 물론이고, 이의 염(예컨대, 약학적으로 허용가능한 염), 또는 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 " α -갈락토시다제 A" 또는 "융합 단백질" 이라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 염의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0165】 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.

【0166】 본 발명의 용어, "약학적으로 허용되는 염" 이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설펜산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설펜산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설펜산, 벤젠설펜산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

【0167】 또한, 본 발명의 용어, "용매화물"은 본 발명에 따른 α -갈락토시다제 A, 융합 단백질 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

【0168】

【0169】 상기 융합 단백질은 당업계에서 알려진 방법으로 준비 또는 제조할 수 있으며, 구체적으로, 동물세포 발현 벡터를 삽입한 동물세포를 배양하여, 배양물로부터 정제할 수 있고, 또는 서열을 기반으로 합성하여 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0170】

【0171】 본 발명의 액상 제제는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 투여로 예방, 치료 또는 개선의 효과를 얻을 수 있는 질환, 예를 들어 α -갈락토시다제 A 결핍증의 예방, 치료 또는 개선을 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0172】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 효소 대체 요법 (enzymatic replacement therapy, ERT)의 약물로서 사용될 수 있다. 상기 효소 대체 요

법은 질환의 원인이 되는 결핍 또는 부족 효소를 보충함으로써, 저하된 효소 기능의 회복을 통해 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

【0173】 구체적으로, 본 발명의 액상 제제는 α -갈락토시다제 A 결핍증의 예방, 치료, 또는 개선을 위해 사용될 수 있다. 상기 α -갈락토시다제 A 결핍증은 리소좀 효소인 α -갈락토시다제 A (α -Gal A)의 결핍으로 야기되는 리소좀 축적 질환으로, 파브리병(Fabry Disease), 광범위 몸통 혈관각화증(Angiokeratoma Diffuse), 광범위 혈관각화증(Angiokeratoma Corporis Diffusum), 또는 유전성 이영양성 지질증(Hereditary Dystopic Lipidosis)의 질환이 포함된다.

【0174】 상기 파브리병은 리소좀 축적 질환 중 하나이며, 성염색체 열성으로 유전하며, X염색체가 불활성화되어 발생한다. α -갈락토시다제 A (α -galactosidase A)의 활성이 결핍되거나, 부족하여 나타나는 당지질(glycosphingolipid)의 선천성 대사이상이다. 상기 α -갈락토시다제 A의 이상에 의해 혈관벽과 신체의 다양한 부위, 예를 들어, 피부, 신장, 심장, 신경계에 Gb3 (globotriaosylceramide)가 비정상적으로 축적되며, 혈류와 영양 공급 감소에 영향을 준다고 알려져 있다. 땀 감소증, 선단지각이상증, 심한 통증, 혈관각화증, 각막혼탁, 심장허혈, 심근경색증, 신장이상 등의 증상이 나타나며, 결국 신장이 제 기능을 못하게 되어 사망하기에 이른다.

【0175】 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 융합 단백질 또는 이를 포함하는 액상 제제의 투여로 질환을 억제 또는 액상 제제의 투여로 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서 용어 "치료"는 융합 단백질 또

는 이를 포함하는 액상 제제의 투여로 목적하는 질환의 증세가 개선, 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

【0176】

【0177】 본 발명의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 액상 제제는 파브리 병의 예방 또는 치료를 위해 이용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0178】 또한, 본 발명의 액상 제제는 피하 투여에 적합한 제형 및 조성을 가져, 피하 투여의 경로로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0179】 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 액상 제제를 도입하는 것을 의미하며, 상기 액상 제제의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 액상 제제의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질이 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0180】

【0181】 본 발명의 융합 단백질의 바람직한 전체 투여 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있고, 액상 제제는 상기 용량을 적절히 투여할 수 있도록 제형화될 수 있다. 그러나 상기 융합 단백질의 용량은 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상

기 본 발명의 액상 제제의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

【0182】

【0183】 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 상기 액상 제제의 제조 방법을 제공한다.

【0184】 구체적으로, 상기 제조방법은 α -갈락토시다제 A 용합 단백질과 완충 용액, 및 아미노산을 서로 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

【0185】 상기 액상 제제는 등장화제, 및 비이온성 계면활성제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0186】 액상 제제 및 이를 구성하는 요소들에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

【0187】

【0188】 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

【0189】

【0190】 실시예 1. 크기 배제 액체 크로마토그래피(Size exclusion liquid chromatography, SE-HPLC)

【0191】

【0192】 크기 배제 크로마토그래피를 위해서는, 먼저 검체를 이동상 (1xP BS, Lonza)을 이용하여 1.0 mg/ml로 희석한 후 멸균 여과(sterile filtration)하고, 여과된 검체 200 μ L를 바이알 인서트(vial insert)에 주입 후 스크류탑 바이알(screw top vial)에 끼워서 준비한다.

【0193】 이후, 이동상을 펌프(pump)에 연결한 후, Waters e2695와 Waters 2489 기기(일본 Waters사 제조)에 0.5mL/min 속도(flow rate)로 이동상을 흘려주며 분석 컬럼(TSKgel G3000SWXL, Tosoh)을 장착한다. 0.5mL/min 속도로 이동상을 30분 이상 흘려주어 검출 신호(detector signal)가 안정화 될 때까지 평형 (equilibrium) 시키고, 오토샘플러(Autosampler)의 온도가 4° C로 떨어지면 검체를 샘플러에 쏜다. 검체를 10 μ L 주입한 뒤, 이동상으로 35분 동안 흘려주어 214nm에서 검출 피크(detection peak)를 확인한다.

【0194】 PC의 Empower Pro software를 이용하여 분석을 수행한다.

【0195】

【0196】 실시예 2. 열 폴림 및 열 응집체 형성 (Thermal unfolding and thermal aggregation) 분석

【0197】

【0198】 온도가 높아짐에 따라 단백질이 풀릴 때(unfolding) 표면에 노출된 트립토판에 의한 방출(emission) 파장을 검출함으로써 단백질이 풀린 정도를 측정할 수 있다. 이와 같은 고유 형광 강도(Intrinsic fluorescence intensity)에 기반한 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry)으로서 UNcle (Unchained Labs) 장비를 사용한다. 상기 장비를 이용하여 단백질의 열 안정성을 분석

하기 위해 Tm(Thermal unfolding) 및 Tagg(Thermal aggregation)를 다음과 같이 측정한다.

【0199】

【0200】 검체 8.8 μ L를 Uni sample loader (Unchained Labs)에 중복하여(duplicate) 주입 후 온도를 25° C부터 시작하여 1° C/min 속도로 95° C까지 증가시킨다. 온도를 증가시키면서 266nm의 여기 파장(Excitation wavelength)에 의해 방출되는 파장 (250 - 720nm)의 강도(intensity)를 측정한다. 형광 데이터 분석(Fluorescence data analysis)은 UNcle Analysis software (Unchained Labs)를 사용하였다.

【0201】

【0202】 상기 분석을 통해 형광 방출 피크의 최대값 시점에서의 온도를 Tm으로 정의하고, 단백질의 473 nm (SLS473)에서의 정적 광산란(static light scattering)을 측정하여 단백질 응집이 시작되는 시점의 온도 (protein aggregation onset temperature)를 Tagg로 정의한다.

【0203】

【0204】 실시예 3. 생물학적 활성(pNP-Gal activity) 분석

【0205】

【0206】 α -갈락토시다제 A(α -Gal A)의 활성 분석에서는 4-니트로페닐- α -D-갈락토피라노사이드 (4-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, pNP-Gal)를 발색(chromogenic) 기질로 사용한다. 가수 분해 시 α -갈락토시다제 A의 작용을 통해

상기 pNP-Gal은 갈락토스 및 4-니트로페놀(4-nitrophenol)로 분해된다. 4-니트로페놀은 밝은 노란색을 나타내어 가수 분해의 시각적 증거를 제공하게 된다.

【0207】

【0208】 분석에 사용되는 버퍼는 다음과 같다.

【0209】 1) 어세이 버퍼(Assay buffer): 20 mM 시트르산, 30 mM 소듐 포스페이트, 0.1% BSA, 0.67% 에탄올 앱솔루트(ethanol absolute, pH 4.6)

【0210】 2) 기질 용액(Substrate solution): 어세이 버퍼 내 24.1 mg/mL pNP-Gal (Sigma)

【0211】 3) 정지 용액(Stop solution): 130 mM 글리신, 83 mM 소듐 카보네이트 (pH 10.6)

【0212】

【0213】 인비트로 활성은 다음과 같이 측정된다.

【0214】 어세이 버퍼로 희석된 샘플(300 ng/mL, 150 ng/mL)을 준비하고, 어세이 버퍼로 희석된 4-Nitrophenol (Sigma)의 표준 용액을 준비한다. 50 μ L의 샘플 및 STD(표준 용액)을 어세이 플레이트(Corning)의 각 웰에 중복하여 로딩한다. 어세이 플레이트 및 기질 용액을 37° C에서 30 분간 배양하여 온도 평형 (temperature equilibrium) 시키고, 기질 용액 50 μ L을 어세이 플레이트에 로딩한다. 상기 어세이 플레이트를 37° C에서 20 분간 배양한 이후 100 μ L 정지 용액을 로딩하여 반응을 멈추고 안정화한다. 이후, 405nm에서의 흡광도를 분석한다 (Multimode Plate Reader, PerkinElmer).

【0215】

【0216】 실시예 4. 탁도(Turbidity) 분석

【0217】

【0218】 탁도는 Lunatic (Unchained Labs)으로 분석한다. 샘플 2.0 μ L 를 Lunatic plate (Unchained Labs)에 주입하고 350nm에서의 탁도를 측정한다. 플라시보 버퍼의 탁도(Turbidity of placebo buffer)는 샘플의 탁도 값에서 빼서 계산한다.

【0219】

【0220】 상기 실시예 실험에 따른 결과는 하기 실험예와 같이 분석하였다.

【0221】

【0222】 실험예 1: α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역의 융합 단백질 제조

【0223】

【0224】 천연형 알파-갈락토시다제 A (alpha-galactosidase A, 서열번호 1) 및 면역글로불린 Fc 영역(서열번호 3)이 링커(서열번호 2)를 통해 연결된 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역의 융합 단백질(이하, α -갈락토시다제 A 융합 단백질, 서열번호 4)을 제조하였다.

【0225】

【0226】 구체적으로, 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 5)를 발현 벡터인 X0GC벡터에 제한효소를 이용하여 삽입하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제작하였다.

【0227】

【0228】 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 DNA 및 단백질 서열은 하기 표 1과 같다. 하기 표 1의 단백질 서열에서 밑줄은 신호서열을, 볼드는 아미노산이 치환된 부분을, 그리고 이탤릭체는 링커를 나타낸다. 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 단량체 두 개가 이량체를 형성한 것이다.

【0229】

【0230】 【표1】

	서열	서열 번호
단백질	<u>MQLRNPELHL</u> <u>GCALALRFLA</u> <u>LVSWDIPGAR</u> <u>ALDNGLARTP</u> <u>TMGWLHWERF</u> <u>MCNLDCQEEP</u> <u>DSCISEKLFM</u> <u>EMAELMVSEG</u> <u>WKDAGYEYLC</u> <u>IDDCWMAQR</u> <u>DSEGRQADP</u> <u>QRFPHGIRQL</u> <u>ANYVHSKGLK</u> <u>LGIYADVGNK</u> <u>TCAGFPGSFG</u> <u>YYDIDAQTFA</u> <u>DWGVDLLKFD</u> <u>GCYCDSLENL</u> <u>ADGYKHMSLA</u> <u>LNRTGRSIVY</u> <u>SCEWPLYMWP</u> <u>FQKPNYTEIR</u> <u>QYCNHWRNFA</u> <u>DIDDSWKSII</u> <u>SILDWTSFNQ</u> <u>ERIVDVAGPG</u> <u>GWNDPDLVI</u> <u>GNFGLSWNQQ</u> <u>VTQMALWAIM</u> <u>AAPLFMSNDL</u> <u>RHISPQAKAL</u> <u>LQDKDVIAIN</u> <u>QDPLGKQGYQ</u> <u>LRQGDNFEVW</u> <u>ERPLSGLAWA</u> <u>VAMINRQEIG</u> <u>GPRSYTIAVA</u> <u>SLGKGVACNP</u> <u>ACFITQLLPV</u> <u>KRKLGFYEWT</u> <u>SRLRSHINPT</u> <u>GTVLLQLENT</u> <u>MQMSLKDLLG</u> <u>GGGSGGGGSG</u> <u>GGGSGGGGSG</u> <u>GGGSGGGGSP</u> PCPAPEFLGG <u>PSVFLFPPKP</u> <u>KDTLMIS RTP</u> <u>EVTCVVVDVS</u> <u>QEDPEVQFNW</u> <u>YVDGVEVHNA</u> <u>CTKPREEQFQ</u> <u>STYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWL</u> <u>NGK</u> <u>EYKCKVSNKG</u> <u>LPSSIEKTIS</u> <u>KAGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSQEE</u> <u>MTKNQVSLTC</u> <u>LVKGFYPSDI</u> <u>AVEWESNGQP</u> <u>ENNYKTPPV</u> <u>LDSDGSFFLY</u> <u>SRLTVDKSRW</u> <u>QEGNVFSCSV</u> <u>MHEAL</u> <u>HNHYT</u> <u>QKSLSLSLGK</u>	4

DNA	ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTTCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT AC CATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTC CTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAG GATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCA GAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTC CCTGG GAGTTTGGGA TACTACGACA TTGATGCCCC GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAAATTGAT GGTGTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTC CTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTG GCCC TTTCAAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGA GAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAATCAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCAT GTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGC CATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGTACCAG CTTAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACGGCA GGAGATTGGT GGAC CTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGAAT TCAAGGTTAA GAAGT CACAT AAATCCCACA GGCAGTGTTC TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAA GA CTTACTTGGC GCGGGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CG GCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTTCTGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCA CAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGA CAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATC GAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAA CAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCA CAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAG TGA	5
-----	--	---

【0231】

【0232】 상기에서 제조된 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 발현하는 벡터 (pXOGC- α galactosidase-Fc)를 CHO-S 세포주에 형질도입하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 대량 생산할 수 있는 세포주를 제조하였다.

【0233】

【0234】 구체적으로, 무혈청 배지(FreeStyle CHO Expression Medium, Thermo Fisher사, cat. No. 12651014)를 이용하여 CHO-S 세포를 1L 삼각 플라스크(Erlenmeyer flask; Corning사, cat. No. 431147)에서 부유배양하며, 배양 용기 내의 세포가 5×10^8 개까지 증식하였을 때, 프리스타일 맥스 (Thermo Fisher사, cat. No. 16447-100)를 이용하여 형질전환시켰다. 즉, 두 개의 튜브에 각각 10mL의 OptiPro SFM(Thermo Fisher사, cat. No. 12309-019)을 넣고, 하나의 튜브에는 500 μ g의 DNA를 넣고, 또 하나의 튜브에는 500 μ L의 프리스타일 맥스를 넣고 두 용액을 섞어 상온에서 10분간 정치한 후, 미리 새로운 프리스타일 CHO 발현 배지(Thermo Fisher사, cat. No. 12651014)로 교체하여준 세포에 넣어주었다. 상기 세포를 37, 5% CO₂, 125 rpm 조건으로 배양기에서 약 96시간 동안 배양하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 제조하였다.

【0235】

【0236】 이와 같이 제조된 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 이량체의 면역글로불린 Fc 영역을 구성하는 2개 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 각각 하나의 α -갈락토시다제 A와 연결되어, 이량체의 면역글로불린 Fc 영역이 두 개의 α -갈락토시다제 A와 융합된 형태를 갖는다.

【0237】

【0238】 실험예 2: 액상 제제의 pH 조건에 따른 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성 확인

【0239】

【0240】 실험예 2-1: 제형 제조

【0241】

【0242】 pH 변화에 따른 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조 변화를 파악하기 위해 다음과 같이 pH를 변경한 액상 제제를 제조하였다.

【0243】

【0244】 【표2】

#	융합 단백질 농도	완충 용액(버퍼)	등장화제	pH
1	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	5.5
2	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	6.0
3	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	6.5
4	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	7.0
5	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	7.5
6	10mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	8.0

【0245】 실험예 2-2: pH 변경에 따른 T_m 및 T_{agg} 측정

【0246】

【0247】 상기 표 2의 여러 제형에서 실시예 2의 UNCLE 장비를 이용하여 T_m 및 T_{agg} 값을 측정하였다.

【0248】

【0249】 그 결과, 도 1과 같이 액상 제제의 pH가 낮을 수록 (pH 5.5에 가까워 질 수록) 높은 T_m 값을 보였으며, pH가 높을 수록 (pH 8.0에 가까워 질 수록) 높은 T_{agg} 값을 갖는 것을 확인하였다.

【0250】 구체적으로, pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 및 8.0에서 각각 T_m 값이 69.8, 69.7, 66.6, 62.3, 57.8 및 52.6℃인 것을 확인하였으며 (도 2), T_{agg} 값은 66.6, 67.5, 66.9, 69.0, 70.0 및 70.1℃인 것을 확인하였다 (도 3).

【0251】 여기에서, T_m 값이 높을수록 단백질의 구조적 안정성이 높은 것을 의미하며, T_{agg} 값이 높을수록 단백질 간 콜로이드 안정성(colloidal stability)이 높은 것을 의미한다.

【0252】

【0253】 이와 같은 결과는 pH 5.5에 가까운 낮은 pH에서 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조적 안정성이 우수하며, 구체적으로는 pH 5.5 내지 6.5에서 특히 우수한 것을 확인하였다.

【0254】

【0255】 또한, 도 1 내지 3을 통해 pH에 따른 T_m 값의 변화 정도가 T_{agg} 의 변화 정도에 비해 높은 것을 확인하여, T_m 값이 T_{agg} 값 대비 pH 민감성(pH-sensitivity)가 높은 것을 확인하였다.

【0256】

【0257】 실험예 2-3: pH 변경에 따른 SE-HPLC 분석 (실온 가속안정성)

【0258】

【0259】 상기 실험예 2-1에서 제조한 pH가 다른 여러 액상 제제의 안정성을 실온 가속안정성 시험을 통해 비교하고자 하였다. 구체적으로, 상기 실험예 2-1의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 샘플은 25°C (65% RH) 저장 초기(initial) 시점 및 7일 후에 분석하였다.

【0260】

【0261】 그 결과, 실온에서 1주 경과 후 pH가 증가됨에 따라 전체 용합 단백질 대비 용해성 응집체(soluble aggregate, HMW)가 증가하는 것을 확인하였으며(도 4), 단편(fragment) 또한 증가하는 것을 확인하였다 (도 5).

【0262】 또한, 실온에서 1주 경과 후 천연형 회수율 (Recovery of Native form)을 확인한 결과, pH 증가에 따라 천연형 회수율이 감소하는 것을 확인하였다 (도 6).

【0263】 여기에서, 용해성 응집체(HMW)는 α -갈락토시다제 A의 일부 도메인의 풀림(unfolding)으로 인해 용해성을 가지면서도 α -갈락토시다제 A의 활성을 유지하는 형태이고, 천연형은 상기 실험예 1에서 제조한 α -갈락토시다제 A 용합 단백질로서, 응집이나 분해가 일어나지 않은 온전한 이량체 형태의 용합 단백질을 의미하며, 단편은 상기 천연형에서 한 분자 또는 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 Fc 영역과 분리되어 본 발명의 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 구조를 상실한 물질을 의미한다. 상기 정의는 하기 실시예에서 동일하게 적용될 수 있다.

【0264】

【0265】 실험예 2-4: pH 변경에 따른 SE-HPLC 분석 (냉장 장기안정성, 6개월)

【0266】

【0267】 상기 실험예 2-1에서 제조한 pH가 다른 여러 액상 제제의 6개월 간의 냉장 장기안정성을 확인하였다. 구체적으로, 상기 실험예 2-1의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 샘플은 5℃ 저장 초기(initial) 시점 및 6개월 후에 분석하였다.

【0268】

【0269】 그 결과, 냉장 보관 6개월 경과 후, pH가 증가됨에 따라 용해성 응집체(soluble aggregate, HMW)가 증가하는 것을 확인하였으며(도 7), 단편(fragment) 또한 증가하는 것을 확인하였다(도 8).

【0270】 또한, 냉장 보관 6개월 경과 후, 천연형 회수율 (Recovery of Native form)을 확인한 결과, pH 증가에 따라 천연형 회수율이 감소하는 것을 확인하였다(도 9).

【0271】

【0272】 상기 실험예 2-3 및 2-4를 통해, 높은 pH의 액상 제제일수록 용해성 응집체의 형성과 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 풀림(unfolding)이 많이 발생하는 것을 확인하였으며, 보관 시에 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조 회복이 어려운 것을 확인하였다. 이와 같은 실험 결과 역시 pH 5.5 내지 6.5의 액상 제제에서 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조적 안정성이 우수한 것을 시사한다.

【0273】

【0274】 실험예 2-5: α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 효소 활성 확인

【0275】

【0276】 실시예 3과 같은 방법으로 액상 제제의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 생물학적 활성을 확인하였다. 구체적으로, 상기 실험예 2-1의 액상 제제 #2 (pH 6.0) 및 #6 (pH 8.0) 제제를 SE-HPLC 및 pNP-Gal 활성 어세이로 분석하였으며, 액상 제제 #2 (pH 6.0)는 25℃ 저장 초기 시점에 분석하였으며, 액상 제제 #6 (pH 8.0)은 25℃ 저장 7일 후에 분석하였다.

【0277】

【0278】 그 결과 도 10의 (a)에 나타난 바와 같이, SE-HPLC 결과, 저장 초기 시점의 pH 6.0의 액상 제제의 천연형(%)은 96.7%, 7일간 상온 보관 된 pH 8.0 액상 제제의 천연형(%)은 64.0%이었다. 또한, 도 10의(b)에서 나타난 바와 같이, pNP-Gal 활성은 분석 편차 수준(< 20%)으로 미미한 차이를 나타내었다. 이를 통해, pH 6.0 및 8.0의 두 액상 제제에서 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 순도에 다소 차이가 있다 하더라도 α -갈락토시다제 A의 활성은 차이가 크지 않은 것을 확인하였다.

【0279】

【0280】 이는, α -갈락토시다제 A의 일부 도메인이 풀려 용해성 응집체를 형성하더라도 효소 활성은 유지할 수 있음을 시사한다.

【0281】

【0282】 실험예 3: 액상 제제의 등장화제 첨가에 따른 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성 확인

【0283】

【0284】 실험예 3-1: 제형 제조

【0285】

【0286】 등장화제(NaCl)의 유무 및 이의 농도 변화에 따른 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조 변화를 파악하기 위해 다음과 같은 액상 제제를 제조하였다.

【0287】

【0288】 【표3】

#	융합 단백질 농도	완충 용액(버퍼)	등장화제	pH
1	10mg/ml	20mM L-히스티딘	-	6.0
2	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	6.0
3	10mg/ml	20mM L-히스티딘	100mM 염화나트륨	6.0
4	10mg/ml	20mM L-히스티딘	200mM 염화나트륨	6.0
5	10mg/ml	20mM L-히스티딘	300mM 염화나트륨	6.0

【0289】 실험예 3-2: 등장화제의 농도에 따른 액상 제제의 SE-HPLC 분석 (실온 가속안정성)

【0290】

【0291】 상기 실험예 3-1에서 제조한 등장화제의 농도가 다른 여러 액상 제제의 안정성을 실온 가속안정성 시험으로 확인하였다. 구체적으로, 상기 실험예 3-1의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 샘플은 25℃ 저장 초기(initial) 시점, 7일 후, 및 14일 후에 분석하였다.

【0292】

【0293】 그 결과, 실온에서 2주 경과 후 등장화제(NaCl)의 농도가 0, 50, 100, 200 및 300mM으로 증가됨에 따라 전체 융합 단백질 대비 용해성 응집체(soluble aggregate, HMW)가 각각 9.4, 9.2, 8.8, 8.8 및 8.7%로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, NaCl이 100mM 이상 첨가된 액상 제제에서는 용해성 응집체의 비율에 차이가 없었다(도 11).

【0294】

【0295】 또한, 실온에서 2주 경과 후 등장화제(NaCl)의 농도가 0, 50, 100, 200 및 300mM으로 증가됨에 따라 전체 융합 단백질 대비 단편은 각각 7.3, 6.0, 5.5, 4.6 및 4.6%로 감소하였다. 또한, NaCl이 200mM 이상 첨가된 액상 제제에서는 단편의 비율에 큰 차이가 없었다(도 12).

【0296】

【0297】 또한, 실온에서 2주 경과 후 천연형 회수율 (Recovery of Native form)을 확인한 결과, NaCl 농도가 증가됨에 따라 천연형 회수율이 증가하는 것을 확인하였으며, NaCl이 200mM 이상 첨가된 액상 제제에서는 큰 차이가 없었다(도 13).

【0298】

【0299】 실험예 4: 액상 제제의 아미노산 첨가에 따른 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 안정성 확인

【0300】

【0301】 실험예 4-1: 안정화제(아미노산, 당, 당알코올)의 종류에 따른 액상 제제의 SE-HPLC 분석 (40℃ 가속안정성)

【0302】

【0303】 안정화제(아미노산, 당, 당알코올)을 포함하는 액상 제제에서 안정화제 종류에 따른 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 구조 변화를 파악하기 위해 다음과 같은 액상 제제를 제조하였다.

【0304】

【0305】 【표4】

#	용합 단백질 농도	완충 용액(버퍼)	등장화제	비이온성 계면활성제	안정화제 (아미노산, 당, 당알코올, 1.0% (w/v))	pH
1	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg	6.0
2	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Lys	6.0

3	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser	6.0
4	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Thr	6.0
5	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Asn	6.0
6	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Gln	6.0
7	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Gly	6.0
8	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Pro	6.0
9	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ala	6.0
10	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Val	6.0
11	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ile	6.0
12	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Leu	6.0
13	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Phe	6.0
14	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Sucrose	6.0
15	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Trehalose	6.0
16	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Sorbitol	6.0

【0306】 상기의 안정화제 종류가 다른 여러 액상 제제의 안정성을 확인하고자 가속안정성 시험을 수행하였으며, 구체적으로, 상기 표 4의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 샘플은 40℃ 저장 15시간 후 분석하였다.

【0307】

【0308】 그 결과, 아르기닌 및 L-세린을 첨가한 액상 제제 #1 및 3의 용해성 응집체의 비율이 각각 9.7, 및 9.8%로 다른 종류의 아미노산을 첨가한 액상 제제에 비해 낮은 것을 확인하였다(도 14).

【0309】

【0310】 실험예 4-2: 아미노산 농도에 따른 T_m 분석

【0311】

【0312】 상기 실험예 4-1을 통해 액상 제제의 안정성 효과를 확인한 아르기닌 및 세린의 농도의 영향을 분석하기 위해 다음과 같이 액상 제제를 제조하였다.

【0313】

【0314】 【표5】

#	융합 단백질 농도	버퍼	등장화제	비이온성 계면활성제	아미노산	pH
1	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	-	5.5
2	10mg/ml	20mM L-히스티딘	200mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	-	5.5
3	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 0.5%(w/v)	5.5
4	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 1.0%(w/v)	5.5
5	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 2.0%(w/v)	5.5
6	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 4.0%(w/v)	5.5
7	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 0.5%(w/v)	5.5
8	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser1.0%(w/v)	5.5
9	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 2.0%(w/v)	5.5
10	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 4.0%(w/v)	5.5
11	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 1.0%(w/v)+Ser 1.0%(w/v)	5.5
12	10mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Arg 2.0%(w/v)+Ser 2.0%(w/v)	5.5

【0315】 실시예 2의 UNCLE 기기를 이용하여 상기 표 5의 #1 내지 #12의 액상 제제에서 T_m 을 측정하였다.

【0316】

【0317】 그 결과, 세린의 첨가 농도가 증가할수록 T_m 값이 비례하여 증가한 반면, 아르기닌의 첨가 농도와 T_m 값의 상관 관계는 확인되지 않았다. 또한, 아르기닌의 경우 2.0, 및 4.0%의 농도로 첨가된 액상 제제는 세린이 2.0, 및 4.0%의 농도로 첨가된 액상 제제에 비해 낮은 T_m 값을 갖는 것을 확인하였다. 더 나아가, 세린 및 아르기닌을 혼합하여 안정화제로 사용하더라도 시너지 효과가 나타나는 것은 아님을 확인하였다(도 15).

【0318】

【0319】 실험예 4-3: 아미노산 농도에 따른 액상 제제의 SE-HPLC 분석 (실온 가속안정성)

【0320】

【0321】 아르기닌 및 세린을 포함하는 액상 제제에서 아미노산 농도에 따른 안정성을 실온 가속안정성 시험을 통해 확인하였다.

【0322】

【0323】 구체적으로, 상기 표 5와 같이 다양한 농도의 세린 및 아르기닌을 포함하는 액상 제제에서 용해성 응집체 생성률 및 천연형 회수율을 측정함으로써 실온 가속안정성을 확인하였다. 상기 표 5의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 액상 제제는 25℃ 저장 초기(initial) 시점, 1일 후, 4일 후 및 7일 후에 분석하였다.

【0324】

【0325】 그 결과, 세린을 첨가한 경우, 저장 기간이 경과함에 따라, 첨가된 세린의 농도가 증가할수록 용해성 응집체의 생성률이 저하되며, 특히, 세린이 0.5%(w/v)의 소량으로만 첨가되어도 대조군(액상 제제 #1 및 2) 대비 용해성 응집체 생성 방지 효과가 우수한 것을 확인하였다. 또한, 아르기닌을 안정화제로 포함한 액상 제제에 비해서도 응집체 생성 방지 효과가 우수한 것을 확인하였다. 도 15와 마찬가지로, 아르기닌 및 세린을 혼합하여 포함하더라도 세린만 포함한 경우와 비교하여 안정성에 큰 차이를 나타내지 않았다(도 16).

【0326】

【0327】 또한, 세린을 첨가한 액상 제제에서는 첨가된 세린의 농도가 증가할수록 천연형 회수율이 증가하며, 특히, 세린이 0.5%(w/v)의 소량으로만 첨가되어도 대조군(액상 제제 #1 및 2) 대비 천연형 회수율이 우수한 것을 확인하였다. 또한, 아르기닌을 안정화제로 포함한 액상 제제에 비해서도 천연형의 형태를 보존하는데 우수한 것을 확인하였다. 도 15와 마찬가지로, 아르기닌 및 세린을 혼합하여 포함하더라도 세린만 포함한 경우와 비교하여 안정성에 큰 차이를 나타내지 않았다(도 17).

【0328】

【0329】 이와 같은 실험 결과는 아미노산, 특히 세린의 첨가로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 구조적 안정성을 높여 α -갈락토시다제 A의 풀림을 방지하고 용해성 응집체가 최대한 형성되지 않도록 하여 액상 제제의 안정성에 기여할 수 있는 것을 시사한다.

【0330】

【0331】 실험예 5: 고농도 α-갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성 확인

【0332】

【0333】 상기 실험예를 통해 안정성이 확인된 액상 제제의 조성을 바탕으로, 고농도의 α-갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 액상 제제로 제조하더라도 안정성이 유지되는 것을 확인하고자 다음과 같이 실험 하였다.

【0334】

【0335】 실험예 5-1: 고농도(50mg/ml) α-갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성 확인 (실온 가속안정성)

【0336】

【0337】 50mg/ml의 α-갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 안정성을 확인하고자 다음과 같은 액상 제제를 제조하였다.

【0338】

【0339】 【표6】

#	융합 단백질 농도	버퍼	등장화제	비이온성 계면활성제	아미노산	pH
1	50mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	—	5.5
2	50mg/ml	20mM L-히스티딘	200mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	—	5.5
3	50mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 0.5%(w/v)	5.5
4	50mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser1.0%(w/v)	5.5
5	50mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 2.0%(w/v)	5.5
6	50mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 4.0%(w/v)	5.5

【0340】 상기 제조된 표 6의 액상 제제를 크기 배제 액체 크로마토그래피로 분석하였으며, 모든 액상 제제는 25℃ 저장 초기(initial) 시점, 1일 후, 4일 후 및 7일 후에 분석하였다.

【0341】

【0342】 그 결과, 저장 기간이 경과함에 따라, 첨가된 세린의 농도가 증가할수록 전체 용합 단백질 대비 용해성 응집체(HMW)의 생성률이 저하되고, 특히, 세린이 0.5%(w/v)의 소량으로만 첨가되어도 대조군(액상 제제 #1 및 2) 대비 용해성 응집체 생성 방지 효과가 우수한 것을 확인하였다(도 18).

【0343】

【0344】 또한, 첨가된 세린의 농도가 증가할수록 천연형 회수율 역시 증가하며, 세린이 0.5%(w/v)의 소량으로만 첨가되어도 대조군(액상 제제 #1 및 2) 대비 천연형 회수율이 우수한 것을 확인하였다(도 19).

【0345】

【0346】 이러한 세린에 의한 용해성 응집체 생성 저해 효과는 10 mg/ml의 용합 단백질을 포함하는 액상 제제에서 보다 50mg/ml의 용합 단백질을 포함하는 액상 제제에서 크게 나타나, 고농도 용합 단백질을 포함하는 액상 제제에서의 세린의 중요성을 시사한다.

【0347】

【0348】 또한, 25℃ 저장 7일 후에 SE-HPLC chromatogram을 분석한 결과, 세린의 농도가 증가할수록 용해성 응집체(HWM1)에서 고차 응집체(higher-order aggregates, HMW2)로의 진행을 현저하게 방지하는 것을 확인하였다 (도 20). 상기 고차

응집체는 용해성 응집체에서 단백질의 풀림 현상이 더 진행되어 형성된 응집체를 의미한다. 고차 응집체가 형성되고 응집체의 크기가 커질수록 면역원성의 위험이 높아지므로, 세린의 첨가로 인해 고차 응집체 형성을 방지함으로써 동결 건조 제제의 안전성을 높일 수 있다.

【0349】

【0350】 이와 유사하게, 세린의 농도가 증가할 수록 용해성 응집체(HMW1)의 형성에 비해, 고차 응집체(HMW2)의 형성이 현저히 감소하였다(도 21).

【0351】

【0352】

【0353】 실험예 5-2: 고농도(90mg/ml) α-갈락토시다제 A 용합 단백질의 안정성 확인 (3주 냉장 안정성)

【0354】

【0355】 상기 실험예 5-1 보다 고농도(90mg/ml)의 α-갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하는 액상 제제의 안정성을 확인하고자 다음과 같이 액상 제제를 제조하였다.

【0356】

【0357】 【표7】

#	용합 단백질 농도	버퍼	등장화제	비이온성 계면활성제	아미노산	pH
1	90mg/ml	20mM L-히스티딘	150mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	-	6.0
2	90mg/ml	20mM L-히스티딘	50mM 염화나트륨	0.05% Polysorbate 20	Ser 2.0%(w/v)	6.0

【0358】 상기 표 7의 제제의 성상(appearance) 및 탁도(turbidity)를 측정하기 위해 육안 검사 및 UV 분광법으로 분석하였다. 분석은 2 내지 8° C 저장의 초기 시점(initial point) 및 21일 후에 수행하였다.

【0359】

【0360】 고농도(90mg/ml) 융합 단백질을 포함하는 액상 제제의 성상을 비교한 결과, 안정화제로 아미노산을 포함하지 않은 액상 제제 #1은 탁한 성상을 나타내나, 세린 2.0%(w/v)을 포함하는 액상 제제 #2는 맑고 투명한 성상을 나타내었다(도 22).

【0361】

【0362】 또한, 탁도를 비교한 결과, 안정화제로 아미노산을 포함하지 않은 액상 제제 #1의 탁도는 49.9로 측정되었고, 세린 2.0%(w/v)을 포함하는 액상 제제 #2의 탁도는 2.8으로 측정되었다. 이로부터, 안정화제로 아미노산(세린)을 포함할 경우 액상 제제의 탁도가 개선되는 것을 확인하여 액상 제제의 안정성이 향상되는 것을 확인하였다(도 23).

【0363】

【0364】 이와 같은 실험 결과는 본 발명의 액상 제제 조성에서 고농도로 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하더라도 안정성을 갖고 있음을 시사하는 것이다.

【0365】

【0366】 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실

시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

【청구범위】

【청구항 1】

α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질을 포함하는 액상 제제로서, 상기 액상 제제는

10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질;

상기 액상 제제의 pH를 5.5 내지 6.5의 범위에서 유지하기 위한 완충 용액;

및

0.5 내지 4.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 액상 제제.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 히스티딘과 그 염, 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 인산과 그 염 또는 이들의 조합을 포함하는 것인, 액상 제제.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 5 내지 200 mM 등장화제를 추가로 포함하는 것인, 액상 제제.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 등장화제는 염화나트륨인, 액상 제제.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 아미노산은 아르기닌, 세린, 트레오닌, 글루타민, 글리신, 알라닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 액상 제제.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 0.005 내지 0.1%(w/v)의 농도로 비이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 것인, 액상 제제.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 비이온성 계면활성제는 폴록사머 188, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 40, 폴리소르베이트 60, 폴리소르베이트 80 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 액상 제제.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 α -갈락토시다제 A는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 액상 제제.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 액상 제제.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 이량체를 형성한 면역글로불린 Fc 영역의 각 단량체에 연결된 것인, 액상 제제.

【청구항 11】

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는

10 내지 90 mg/ml의 융합 단백질;

10 내지 50 mM 히스티딘;및

1.0 내지 4.0%(w/v)의 세린을 포함하는 액상 제제.

【청구항 12】

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 파브리병의 예방 또는 치료를 위한 것인, 액상 제제.

【청구항 13】

제1항에 있어서, 상기 액상 제제는 피하 투여의 경로로 투여되는 것인, 액상 제제.

【요약서】

【요약】

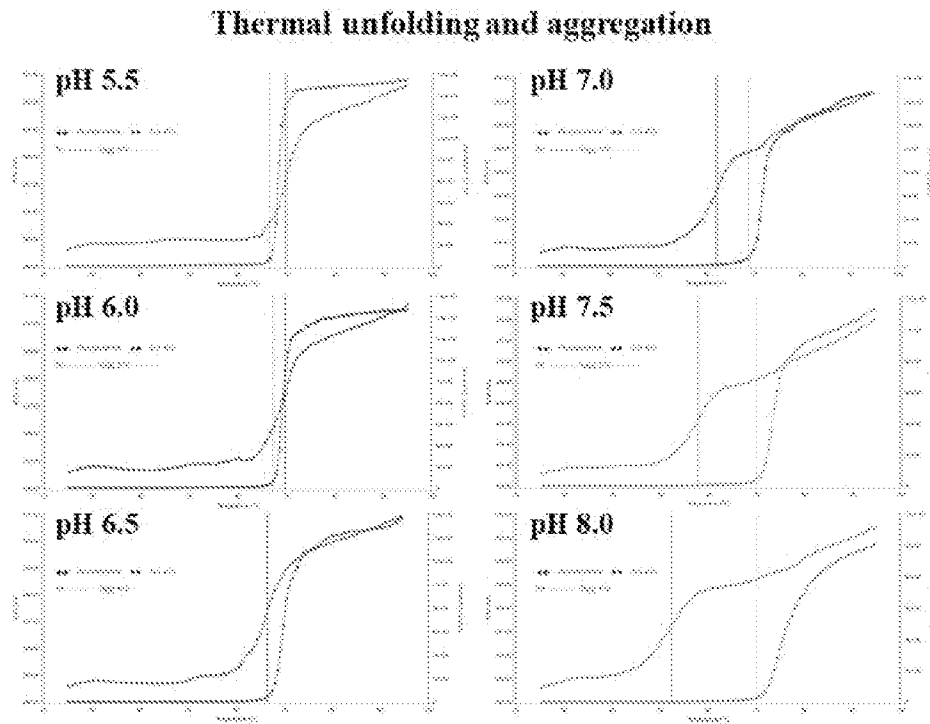
본 발명은 α -갈락토시다제 A의 융합 단백질을 포함하는 액상 제제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

【대표도】

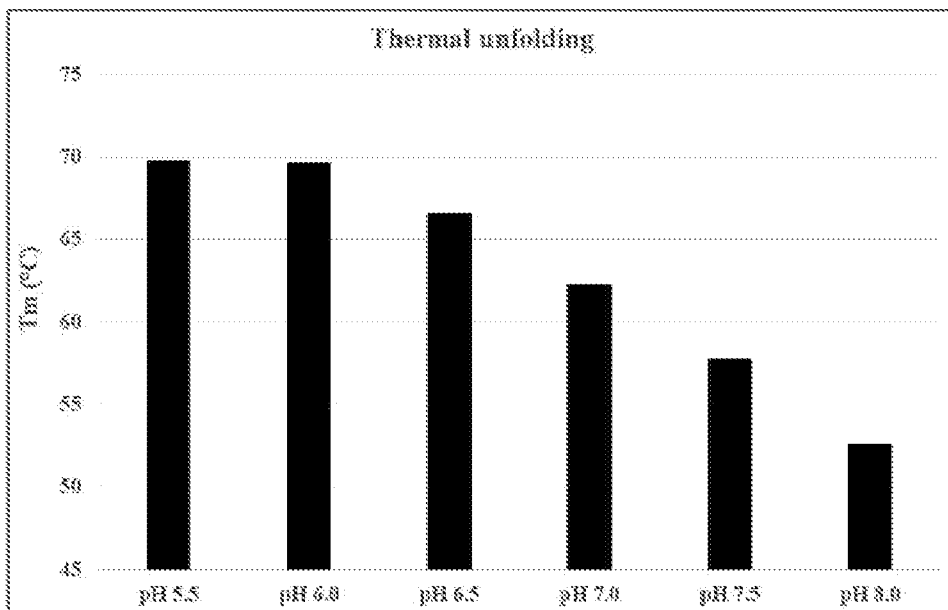
도 15

【도면】

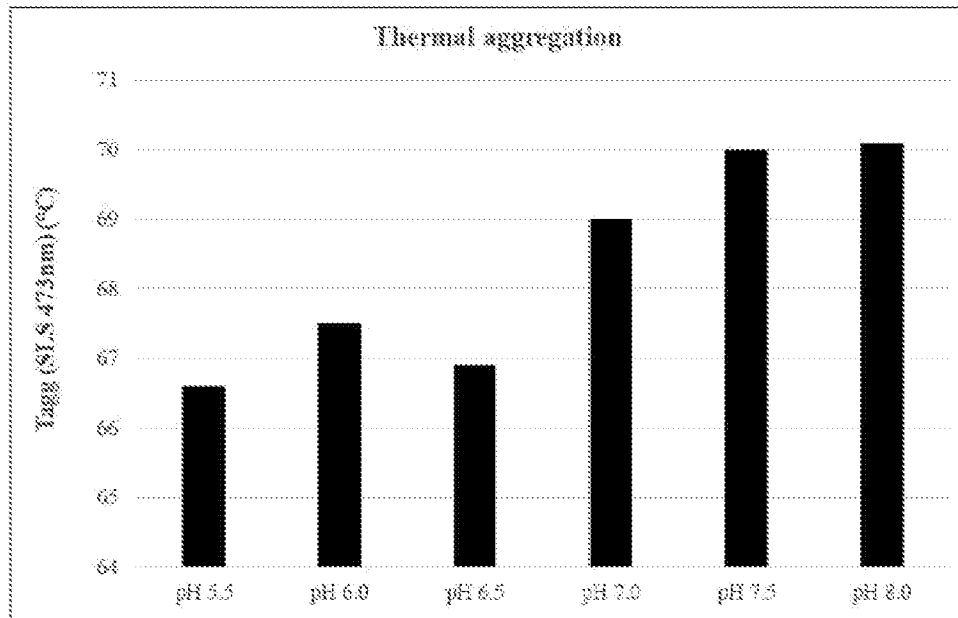
【도 1】



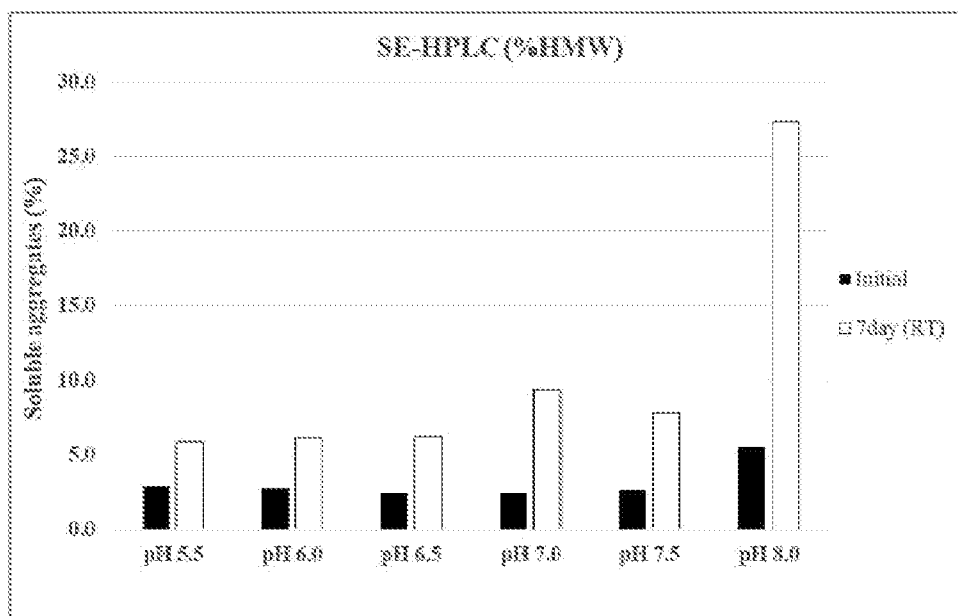
【도 2】



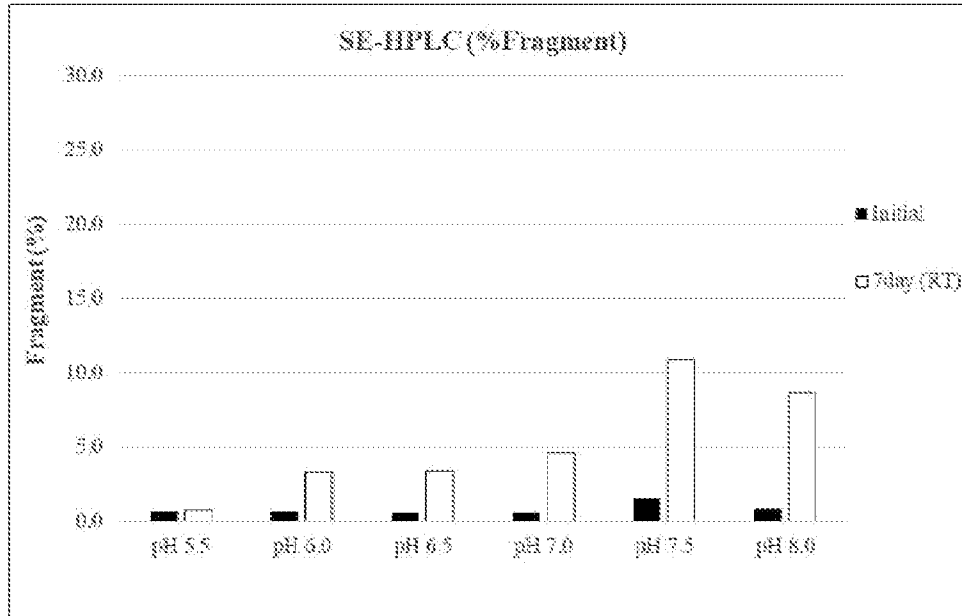
【도 3】



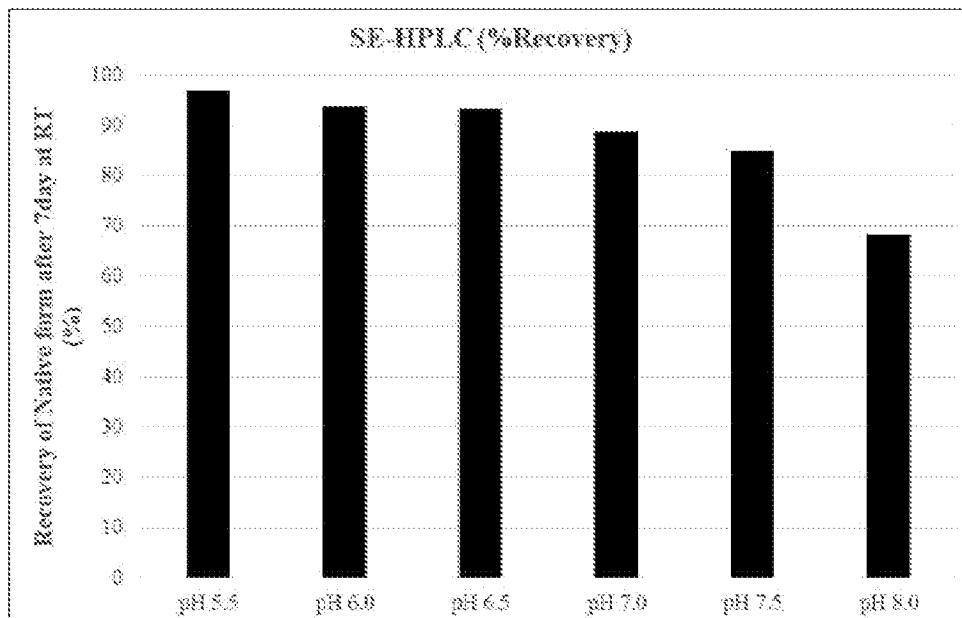
【도 4】



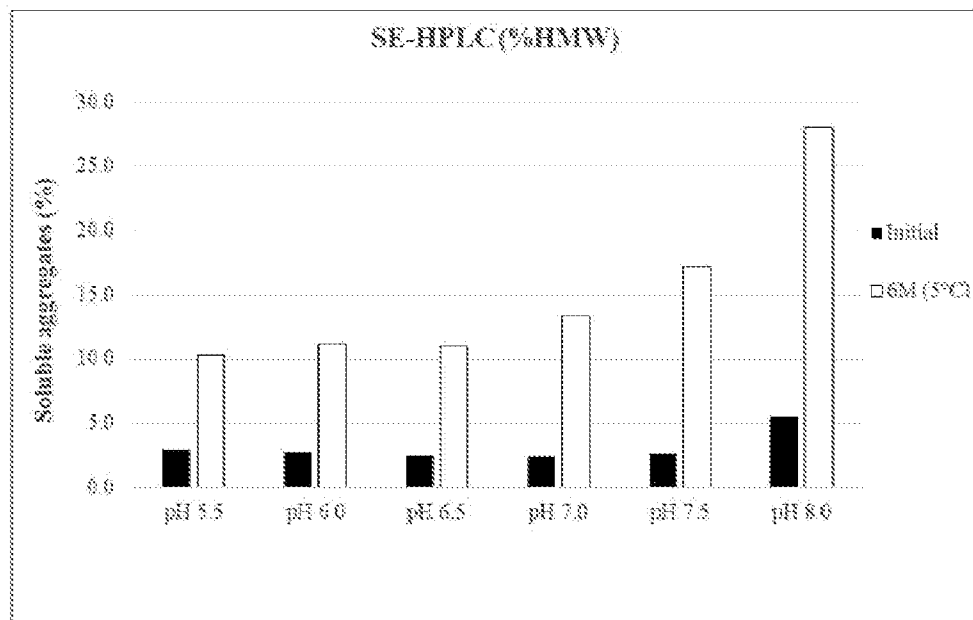
【도 5】



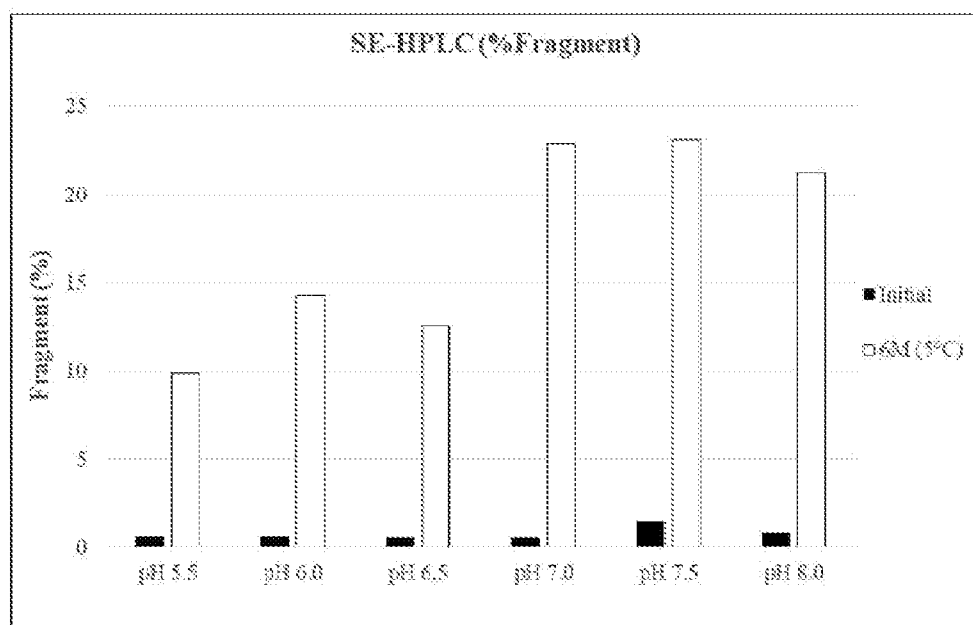
【도 6】



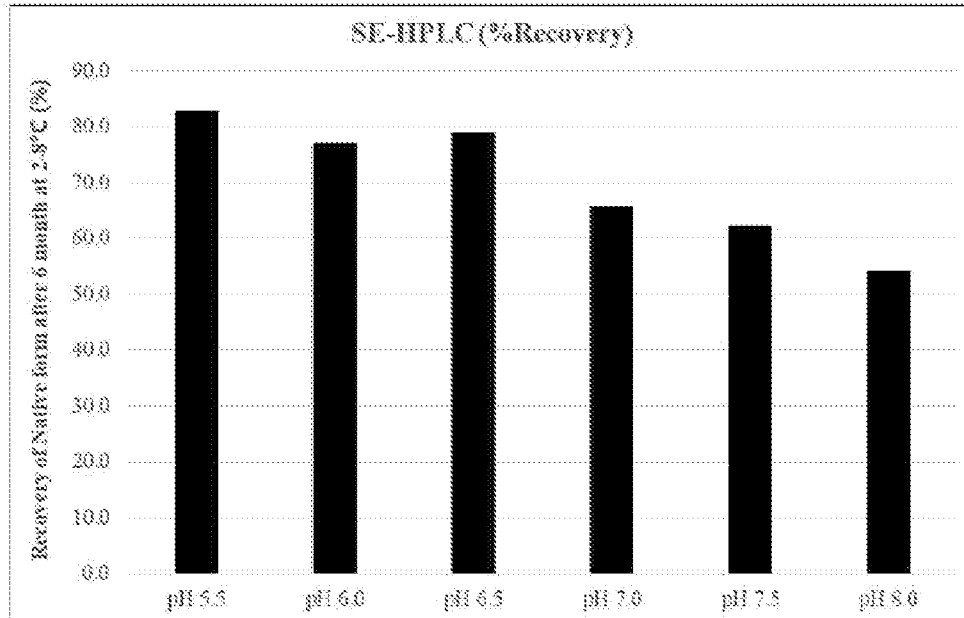
【도 7】



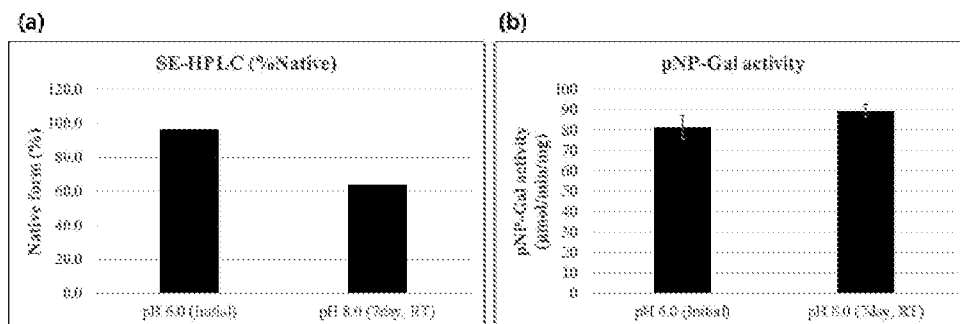
【도 8】



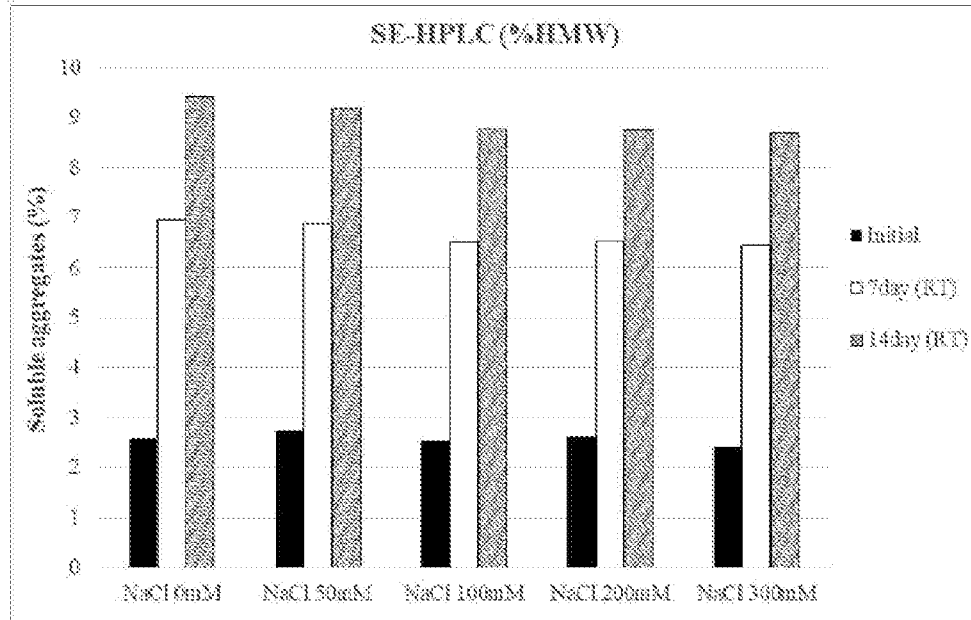
【도 9】



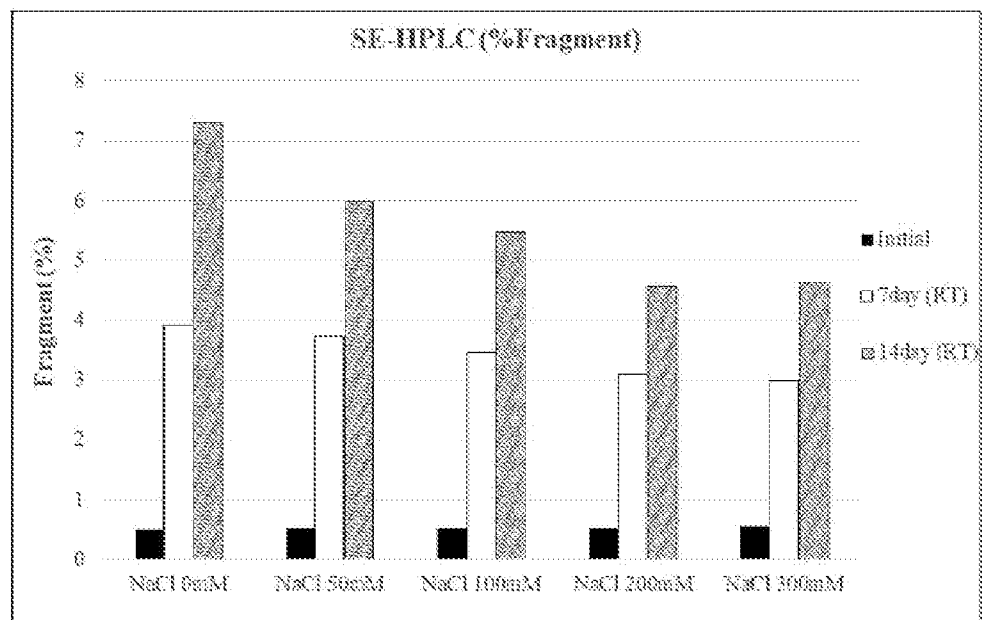
【도 10】



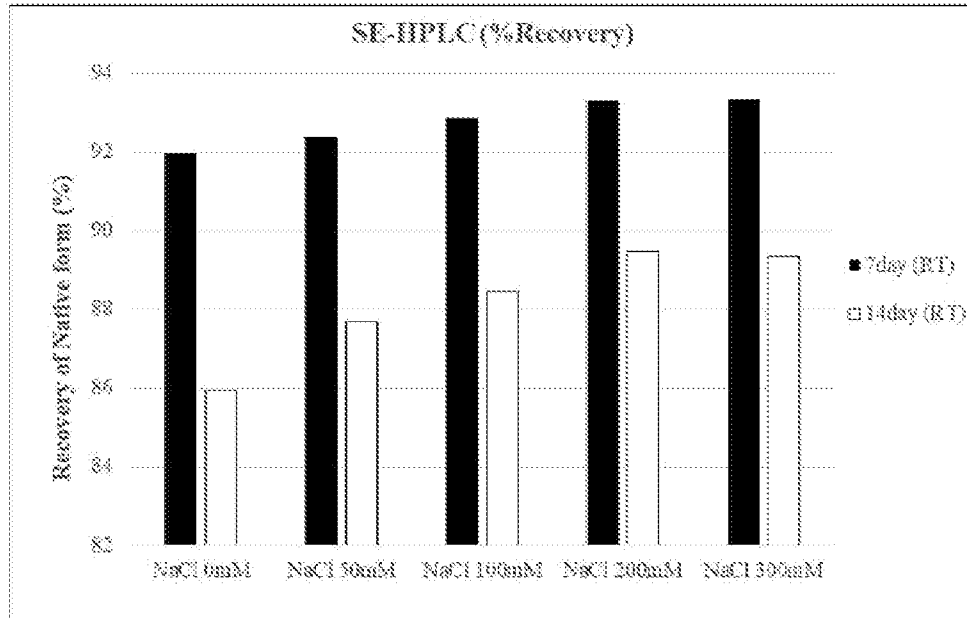
【図 11】



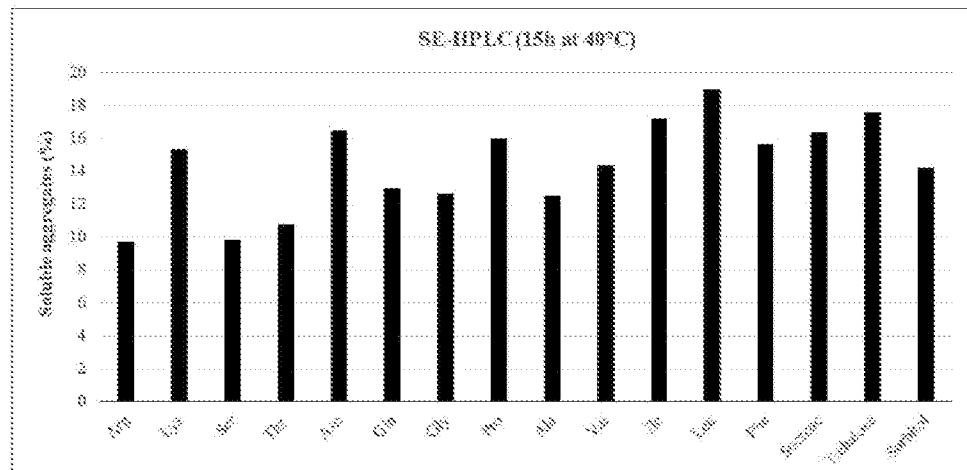
【図 12】



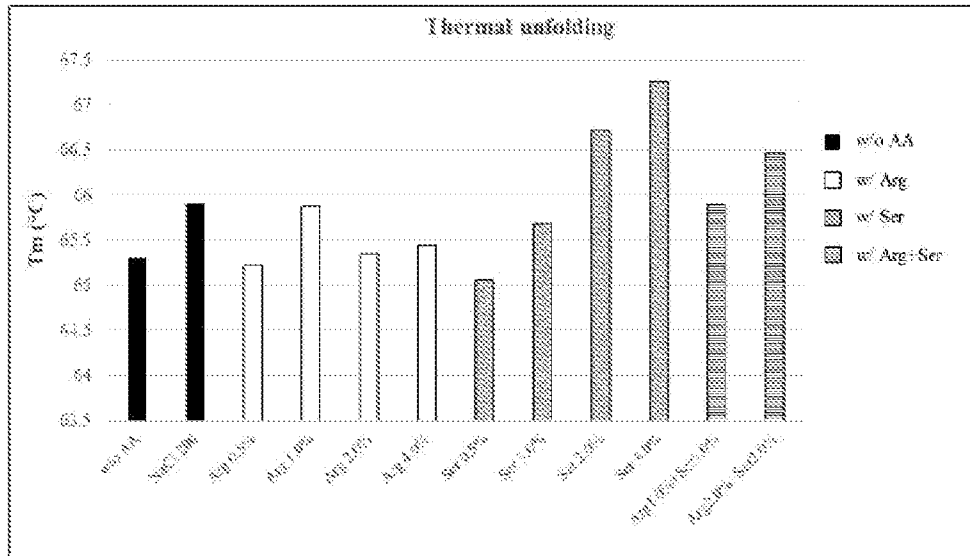
【도 13】



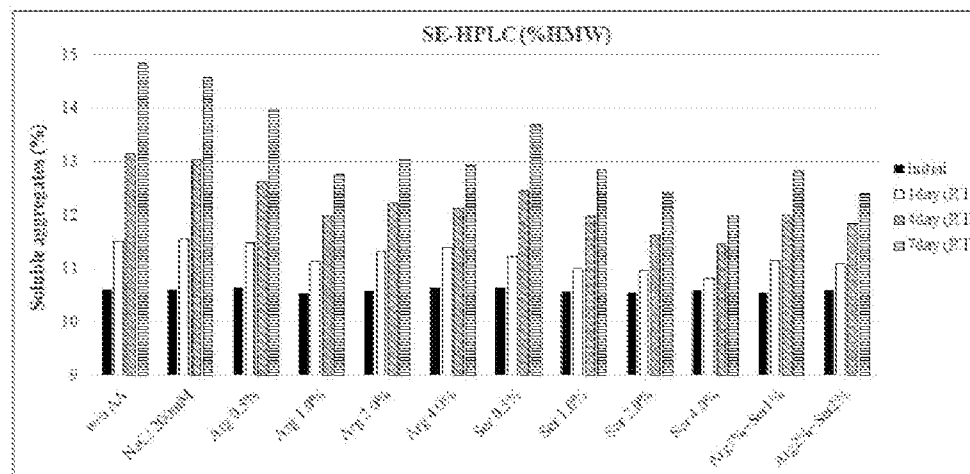
【도 14】



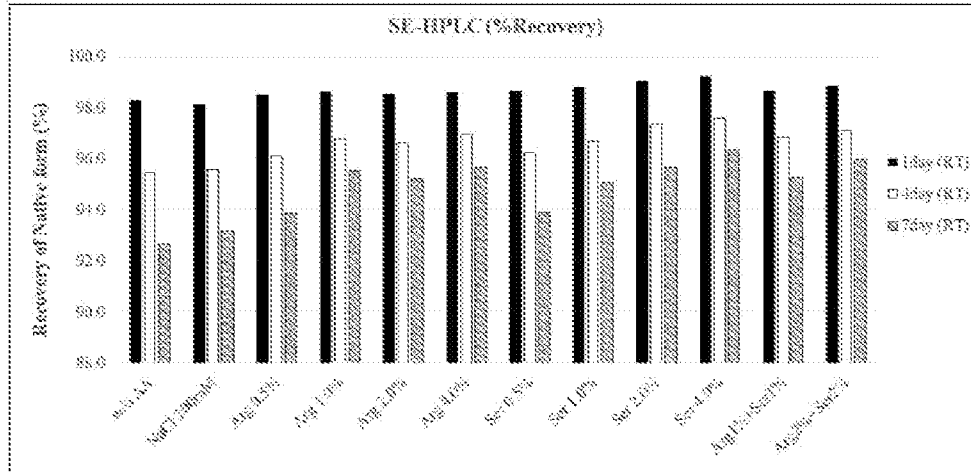
【도 15】



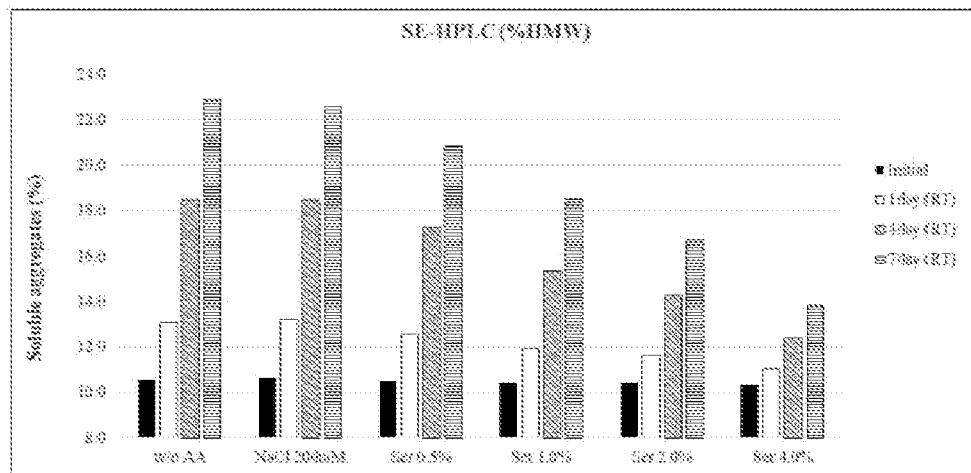
【도 16】



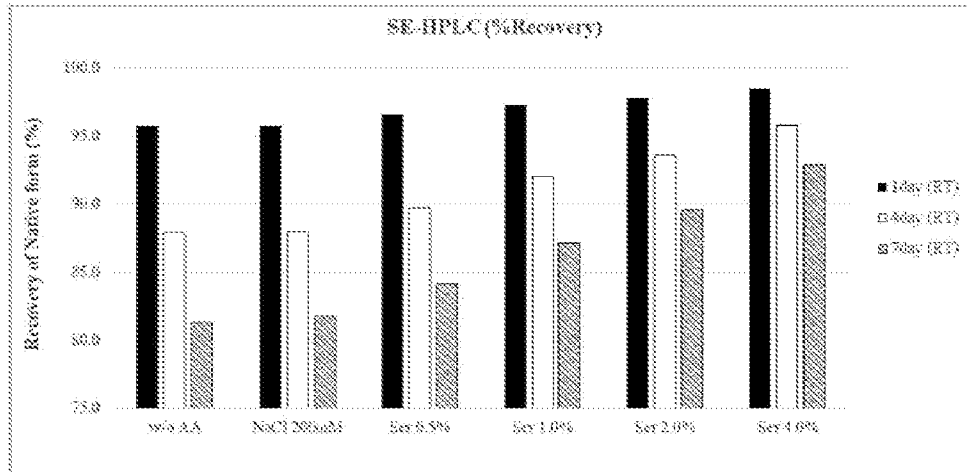
【도 17】



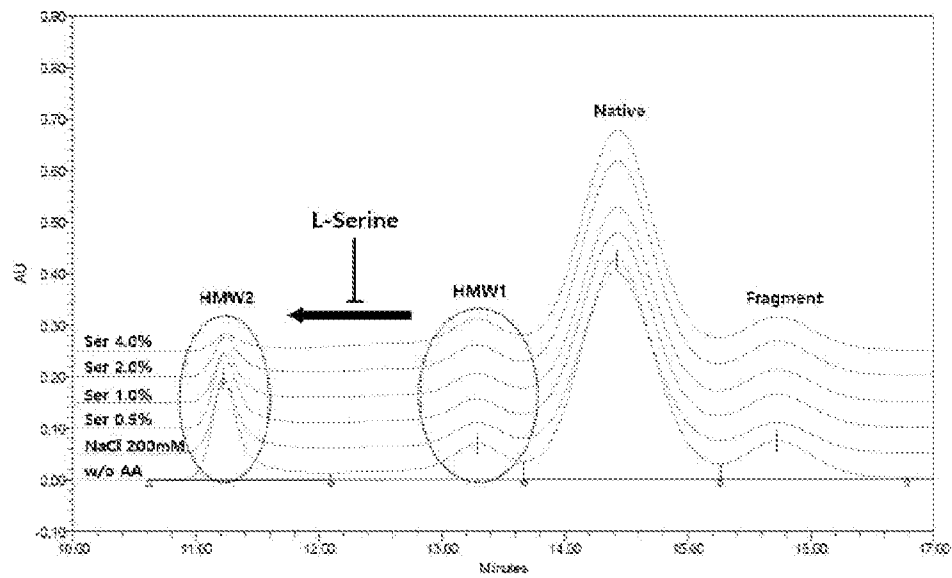
【도 18】



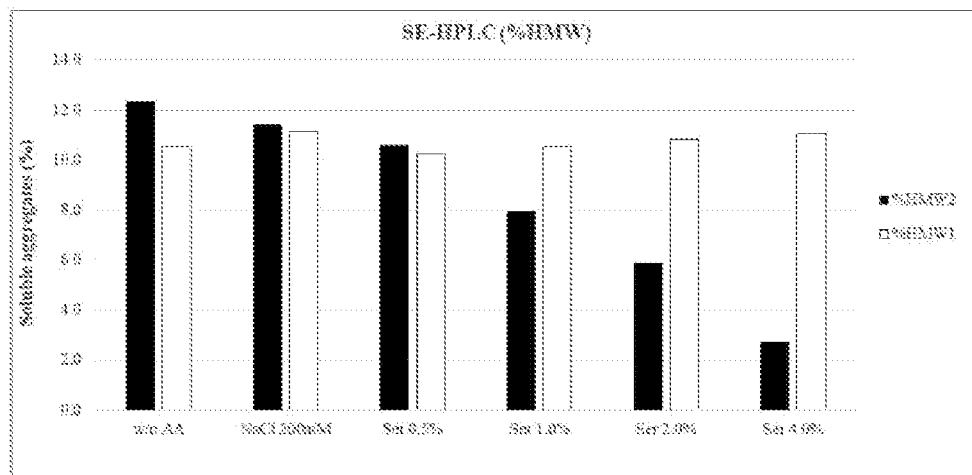
【도 19】



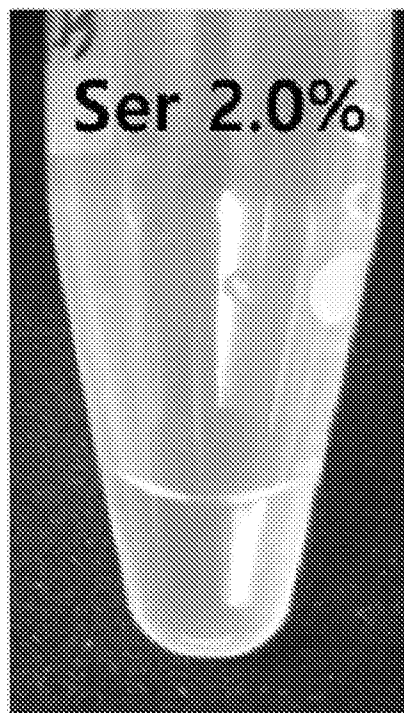
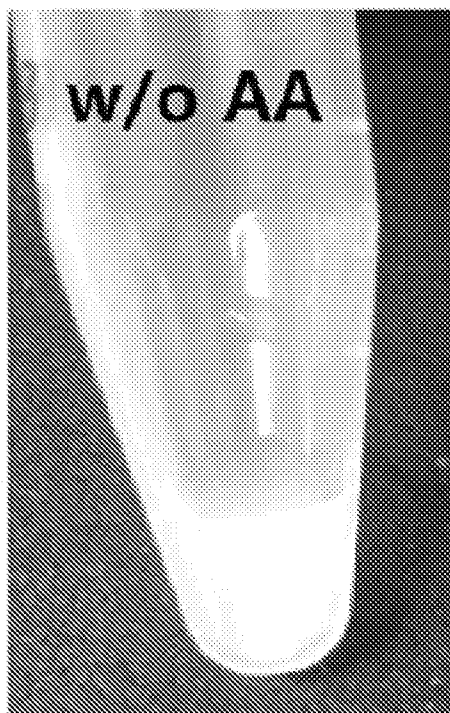
【도 20】



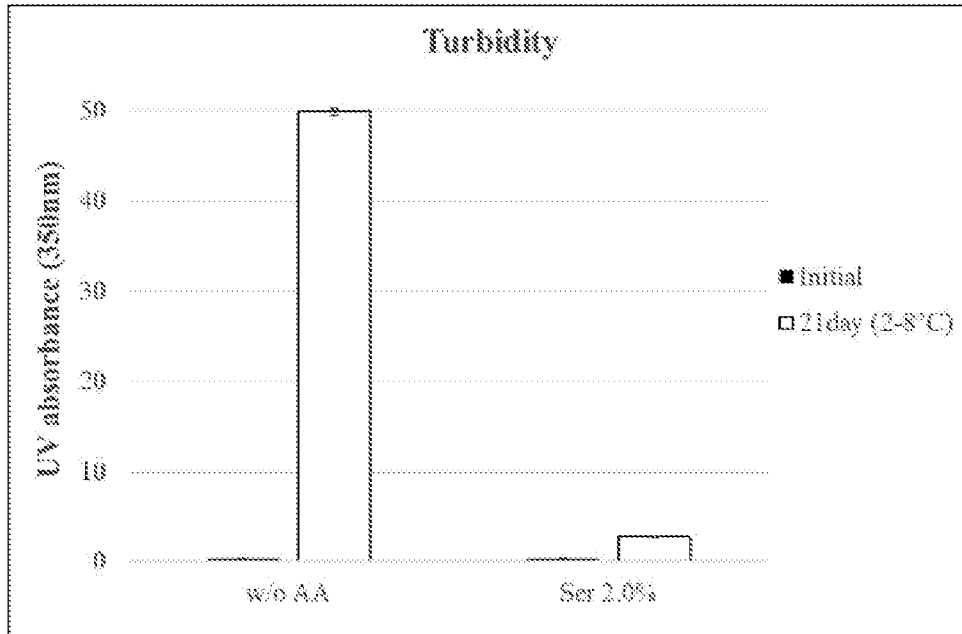
【도 21】



【도 22】



【도 23】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

<110> GREEN CROSS CORPORATION
HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Liquid Formulation comprising a fusion protein including
alpha-galactosidase A

<130> KPA220033-KR

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 429

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu

1 5 10 15

Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu

20 25 30

Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu

35 40 45

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile

50 55 60

Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly

65	70	75	80
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met			
	85	90	95
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg			
	100	105	110
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly			
	115	120	125
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly			
	130	135	140
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala			
145	150	155	160
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser			
	165	170	175
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn			
	180	185	190
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met			
	195	200	205
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn			
	210	215	220
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys			
225	230	235	240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
245 250 255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
260 265 270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
275 280 285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
290 295 300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305 310 315 320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
325 330 335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
340 345 350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala
355 360 365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
370 375 380

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
405 410 415

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
420 425

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> peptide linker

<400> 2
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 3
<211> 221
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fc varinat

<400> 3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln

145	150	155	160
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
	165	170	175
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	180	185	190
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn			
	195	200	205
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
	210	215	220

<210> 4

<211> 680

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> alpha galactosidase-Fc fusion protein

<400> 4

Met Gln Leu Arg Asn Pro Glu Leu His Leu Gly Cys Ala Leu Ala Leu

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Phe Leu Ala Leu Val Ser Trp Asp Ile Pro Gly Ala Arg Ala Leu

20	25	30
----	----	----

Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu

35

40

45

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile

50

55

60

Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly

65

70

75

80

Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met

85

90

95

Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg

100

105

110

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly

115

120

125

Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly

130

135

140

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala

145

150

155

160

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser

165

170

175

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn

180

185

190

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met
195 200 205

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn
210 215 220

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys
225 230 235 240

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val
245 250 255

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn
260 265 270

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala
275 280 285

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser
290 295 300

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn
305 310 315 320

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn
325 330 335

Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala
340 345 350

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala

355	360	365	
Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile			
370	375	380	
Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr			
385	390	395	400
Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln			
405	410	415	
Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu Gly Gly Gly			
420	425	430	
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
435	440	445	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Pro Cys Pro Ala			
450	455	460	
Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
465	470	475	480
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
485	490	495	
Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
500	505	510	
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
515	520	525	

Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
530 535 540

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
545 550 555 560

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
565 570 575

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
580 585 590

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
595 600 605

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
610 615 620

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
625 630 635 640

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
645 650 655

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
660 665 670

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
675 680

<210> 5

<211> 2043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> alpha galactosidase-Fc fusion protein

<400> 5

atgcagctga ggaaccacaga actacatctg ggctgcgcgc ttgcgcttcg cttcctggcc
60

ctcgttttcct gggacatccc tggggctaga gcactggaca atggattggc aaggacgcct
120

accatgggct ggctgcactg ggagcgcttc atgtgcaacc ttgactgccca ggaagagcca
180

gattcctgca tcagtgagaa gctcttcatt gagatggcag agctcatggt ctcagaaggc
240

tggaaggatg caggttatga gtacctctgc attgatgact gttggatggc tccccaaga
300

gattcagaag gcagacttca ggcagaccct cagcgctttc ctcatgggat tcgccagcta
360

gctaattatg ttcacagcaa aggactgaag ctagggattt atgcagatgt tggaaataaa
420

acctgcgcag gcttccttgg gagttttgga tactacgaca ttgatgccca gacctttgct
480

gactggggag tagatctgct aaaatttgat ggttggttact gtgacagttt ggaaaatttg
540

gcagatggtt ataagcacat gtccttggcc ctgaatagga ctggcagaag catttgttac
600

tcctgtgagt ggccctcttta tatgtggccc ttccaagaag ccaattatac agaaatccga
660

cagtactgca atcactggcg aaattttgct gacattgatg attcctggaa aagtataaag
720

agtatcttgg actggacatc ttttaaccag gagagaattg ttgatgttgc tggaccaggg
780

ggttgggaatg acccagatat gttagtgatt ggcaactttg gcctcagctg gaatcagcaa
840

gtaactcaga tggccctctg ggctatcatg gctgctcctt tattcatgtc taatgacctc
900

cgacacatca gccctcaagc caaagctctc cttcaggata aggacgtaat tgccatcaat
960

caggacccct tgggcaagca agggtagcag ctttagacagg gagacaactt tgaagtgtgg
1020

gaacgacctc tctcaggctt agcctgggct gtagctatga taaaccggca ggagatttgt
1080

ggacctcgct cttataccat cgcagttgct tccctgggta aaggagtggc ctgtaatcct
1140

gcctgcttca tcacacagct cctccctgtg aaaaggaagc tagggttcta tgaatggact

1200

tcaaggttaa	gaagtcacat	aaatcccaca	ggcactgttt	tgcttcagct	agaaaataca
------------	------------	------------	------------	------------	------------

1260

atgcagatgt	cattaaaaga	cttacttggc	ggcggaggtt	caggtaggtg	tggctctggc
------------	------------	------------	------------	------------	------------

1320

ggtggaggg	cggggggagg	cggctctgga	ggagggggct	ccggtggggg	aggtagccca
-----------	------------	------------	------------	------------	------------

1380

ccatgcccag	cacctgagtt	cctgggggga	ccatcagttt	tcctgttccc	cccaaaaccc
------------	------------	------------	------------	------------	------------

1440

aaggacaccc	tcatgatctc	ccggacccct	gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc
------------	------------	------------	------------	------------	------------

1500

caggaagacc	ctgagggtcca	gttcaactgg	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc
------------	-------------	------------	------------	------------	------------

1560

aagacaaagc	cgcgaggagga	gcagttccaa	agcacgtacc	gtgtgggtcag	cttcctcacc
------------	-------------	------------	------------	-------------	------------

1620

gtcctgcacc	aggactggct	gaatggcaag	gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaaggc
------------	------------	------------	------------	-------------	------------

1680

ctcccatcct	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaagccaaag	ggcagccccg	agaaccacag
------------	------------	------------	------------	------------	------------

1740

gtgtacaccc	tgtcccatc	ccaggaggag	atgaccaaga	accagggtcag	cctgacctgc
------------	-----------	------------	------------	-------------	------------

1800

ctgggtcaaag	gtttctatcc	cagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcagccg
-------------	------------	------------	------------	------------	------------

1860

gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac
1920

agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtagg caggagggga acgtcttctc atgctccgtg
1980

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa
2040

tga
2043