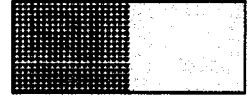




DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/KR2024/013486
International filing date:	06 September 2024 (06.09.2024)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: KR
	Number: 10-2023-0122402
	Filing date: 14 September 2023 (14.09.2023)
Date of receipt at the International Bureau:	25 September 2024 (25.09.2024)

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.

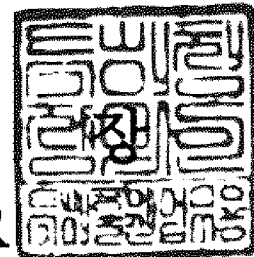
출 원 번 호 : 10-2023-0122402
Application Number

출 원 년 월 일 : 2023년 09월 14일
Filing Date SEP 14, 2023

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

2024 년 09 월 24 일

특 허 청
COMMISSIONER



접수	2023.09.14.
----	-------------

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	KPA231047
【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 신규한 동결 건조 제제
【발명의 영문명칭】	Novel lyophilized formulation comprising a fusion protein including α -galactosidase A

【발명자】

【성명】 손종문

【성명의 영문표기】 Son Jong Mun

【주민등록번호】 761203-1XXXXXX

【우편번호】 16924

【주소】 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107(목암BLDG)

【발명자】

【성명】 지나리

【성명의 영문표기】 Na Ri Ji

【주민등록번호】 861225-2XXXXXX

【우편번호】 16924

【주소】 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107(목암BLDG)

【발명자】

【성명】 유미리

【성명의 영문표기】 Miri Yoo

【주민등록번호】 910825-2XXXXXX

【우편번호】 16924

【주소】 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107(목암BLDG)

【발명자】

【성명】 이혜진

【성명의 영문표기】 Lee Hye Jin

【주민등록번호】	931027-2XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107(목암BLDG)
【발명자】	
【성명】	손재운
【성명의 영문표기】	Jae Woon Son
【주민등록번호】	780127-1XXXXXX
【우편번호】	16924
【주소】	경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107(목암BLDG)
【발명자】	
【성명】	김상운
【성명의 영문표기】	Kim Sang Yun
【주민등록번호】	840215-2XXXXXX
【우편번호】	18469
【주소】	경기도 화성시 동탄기흥로 550
【발명자】	
【성명】	김진영
【성명의 영문표기】	Kim Jin Young
【주민등록번호】	840101-1XXXXXX
【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

【출원언어】 국어

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 5

위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인 한얼 (서명 또는 인)

【수수료】

【기본출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】	76 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	46,000원
【감면사유】	중견기업(30%감면)[2]
【감면후 수수료】	32,200 원

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

α -갈락토시다제 A의 융합단백질을 포함하는 신규한 동결 건조 제제 {Novel lyophilized formulation comprising a fusion protein including α -galactosidase A}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 α -갈락토시다제 A의 융합단백질을 포함하는 동결 건조 제제 및 이의 제조 방법과 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(alpha-galactosidase A)의 효소 활성 결핍 또는 부족에 의한 결과로 나타나는 당지질(glycosphingolipid)의 선천성 대사이상의 일종이다. α -갈락토시다제 A 결핍증의 대표적인 질환인 파브리병은 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 동결 건조 제제의 경우, 단백질 침전 등이 문제되어 보관 안정성이 크게 낮아지기 때문에 기존의 동결 건조 제제는 모두 5mg/ml 이하로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함한다. 그러나, 약효의 증대를 위해 고농도로 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 포함하면서도 안정성이 높은 제제를 개발하는 것이 필요하다.

【0010】

【0011】또한, 단백질 의약품의 동결 건조 과정에서 단백질의 구조나 기능이 상실되는 등의 문제점으로 인해, 단백질의 구조와 활성을 유지하면서도 장기간 보관할 수 있는 동결 건조 제제의 제조에는 어려움이 있다. 이에, 장기 보관에도 안정하면서 단백질 회수율을 높일 수 있는 동결 건조 제제의 개발이 요구된다.

【0012】

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

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

【0014】 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 동결 건조 제제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【0015】 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 동결 건조 제제를 재구축 하는 방법을 제공하는 것이다.

【0016】

【과제의 해결수단】

【0017】 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제이다.

【0018】 하나의 구체예에서, 상기 동결 건조 제제는 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질; 완충 용액; 및 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0019】 다른 하나의 구체예에서, 상기 동결 건조 제제는 1 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 및 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0020】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 동결 건조 제제는 1 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0021】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 동결 건조 제제는 1 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내

지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 및 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0022】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 동결 건조 제제는 1 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; 5 내지 30 mM 히스티딘을 포함하는 pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 0.001 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트 20; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 세린을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0023】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

【0024】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 당알코올은 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.

【0025】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 수용액은 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

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

【0027】 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 수용액은 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0028】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 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 동결 건조 제제로서, 상기 완충용액은 히스티딘과 그 염, 구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 인산과 그 염, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0030】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 완충용액은 5 내지 30 mM 히스티딘을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0031】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 수용액은 등장화제를 추가로 포함하지 않는 것을 특징으로 한다.

【0032】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 등장화제는 염화나트륨인 것을 특징으로 한다.

【0033】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 α -갈락토시다제 A는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0034】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0035】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0036】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 유래인 것을 특징으로 한다.

【0037】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것을 특징으로 한다.

【0038】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 융합 단백질은 두 분자의 α -갈락토시다제 A가 이량체를 형성한 면역글로불린 Fc 영역의 각 단량체에 연결된 것을 특징으로 한다.

【0039】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제로서, 상기 동결 건조 제제는 파브리병의 예방 또는 치료를 위한 것을 특징으로 한다.

【0040】본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 동결 건조 제제를 제조하는 방법이다.

【0041】하나의 구체예로서, 상기 동결 건조 제제의 제조 방법은 i) α -갈락토시다제 A와 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 α -갈락토시다제 A 융합 단백질, ii) 완충용액, 및 iii) 당 또는 당알코올을 함유하는 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0042】다른 구체예로서, 상기 동결 건조 제제의 제조 방법은 상기 수용액에 아미노산, 비이온성 계면활성제, 보존제, 또는 이들의 조합을 추가로 혼합하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0043】앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 동결 건조 제제의 제조 방법은 융합 단백질, 완충용액, 당, 당알코올, 아미노산, 비이온성 계면활성제, 보존제, 또

는 이들의 조합을 하나 이상 포함하는 1 내지 10 mL의 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0044】 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 상기 동결 건조 제제에 재구축 용액을 첨가하는 단계를 포함하는 동결 건조 제제를 재구축 하는 방법이다.

【0045】 하나의 구체예로서, 상기 재구축 용액은 증류수인 것을 특징으로 한다.

【0046】 다른 구체예로서, 상기 방법으로 재구축된 제제는 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 10 내지 100mg/mL 농도로 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0047】

【발명의 효과】

【0048】 본 발명에 따른 동결 건조 제제는 α -갈락토시다제 A의 용합 단백질을 장기간 안정적으로 보관할 수 있을 뿐만 아니라, 재구축시 회수율을 높여 환자에게 투여시 올바른 용량을 투여할 수 있게 할 수 있다.

【0049】

【도면의 간단한 설명】

【0050】 도 1은 pH 조건에 따른 동결 건조 제제의 용해 직후 및 용해 후 3일 경과 시점에서 케이크 성상을 비교한 도이다.

도 2는 pH 조건에 따른 동결 건조 제제의 천연형 회수율을 비교한 도이다.

도 3 및 4는 당 또는 당알코올을 포함하는 동결 건조 제제의 성상을 비교한 도이다.

도 5는 pH 6.5에서 당 또는 당알코올 첨가에 따른 동결 건조 제제의 천연형 회수율을 비교한 도이다.

도 6은 pH 6.8에서 당 또는 당알코올 첨가에 따른 동결 건조 제제의 천연형 회수율을 비교한 도이다.

도 7은 당(수크로스) 농도 변화에 따른 동결 건조 제제의 성상을 비교한 도이다.

도 8은 당(수크로스) 농도 변화에 따른 동결 건조 제제의 천연형 회수율을 비교한 도이다.

도 9는 최적 조성의 동결 건조 제제의 6개월 간 냉장 보관의 성상을 확인한 도이다.

도 10은 최적 조성의 동결 건조 제제의 3개월 및 6개월 시점에서 천연형 회수율을 비교한 도이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0051】 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다.

【0052】 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.

【0053】 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.

【0054】 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.

【0055】

【0056】 알라닌 Ala, A 아르기닌 Arg, R

【0057】 아스파라긴 Asn, N 아스파르트산 Asp, D

【0058】 시스테인 Cys, C 글루탐산 Glu, E

【0059】 글루타민 Gln, Q 글리신 Gly, G

【0060】 히스티딘 His, H 이소류신 Ile, I

【0061】 류신 Leu, L 리신 Lys, K

【0062】 메티오닌 Met, M 페닐알라닌 Phe, F

【0063】 프롤린 Pro, P 세린 Ser, S

【0064】 트레오닌 Thr, T 트립토판 Trp, W

【0065】 티로신 Tyr, Y 발린 Val, V

【0066】

【0067】 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 α -갈락토시다제 A 및 번역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제를 제공한다.

【0068】 구체적으로, 본 발명은 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 서로 연결된 융합 단백질을 약리학적 유효량으로 포함하고, 완충 용액, 및 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 동결 건조 제제에 관한 것이다. 또한, 상기 수용액은 아미노산, 비이온성 계면활성제, 보존제, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0069】

【0070】 본 발명에서 용어 "동결 건조 제제"는 의약품의 형태를 동결 건조로 제제화한 약물을 의미한다. 구체적으로, α -갈락토시다제 A 융합 단백질이 이를 안정화시키기 위한 부형제 등의 물질과 함께 동결 건조되어 고체 상태로 존재하는 것일 수 있다. 상기 동결 건조 제제의 약리효과를 나타내는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질 이외에 동결건조 제제에 포함되는 성분은 안정화제와 혼용될 수 있다. 본 발명에서 용어, "안정화제"란 제제에서 유효성분 등의 구성 성분을 일정 기간 동안 안정하게 유지시키는 물질을 말한다.

【0071】

【0072】 본 발명에서, 동결 건조 제제는 동결 건조 물질을 포함하는 개념이다. 상기 동결 건조 제제는, α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 안정화시키기 위한 안정화제를 포함하는 예비-동결 건조 제제(pre-lyophilized formulation)와 α -갈락토시다제 A 융합 단백질이 모두 포함된 예비 제형 형태에서, 동결 및 건조 과정을 거쳐 제조된다. 본 발명에서, 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 동결 건조 제제는 치료학적 유효량의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함할 수 있으며, α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 치료학적 유효량은 1회용 용기(single-use con

tainer) 또는 다회용 용기(multi-use container)에 함유되고, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 동결 건조 제제는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 동결 건조 과정에서 안정화시킬 수 있는 조성을 가지며, 이를 보관한 후 재구축하는 경우에도 제제의 안정성이 유지될 수 있을 뿐만 아니라, α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 회수율이 높은 장점을 갖는다. 더욱이, 본 발명의 동결 건조 제제는 고농도인 10 mg/mL 내지 40 mg/mL의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하여도 안정성을 유지할 수 있는 효과를 가진다.

【0073】 또한, 본 발명에 따른 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제는 용기에 보관되다가 개체에 투여가 필요한 경우 등에 있어 재구축될 수 있다.

【0074】 본 발명에서 용어, "재구축"이란, 고체 상태의 상기 동결 건조 물질을 액상화(용해)하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 투여할 수 있게 하는 것을 의미한다. 이때, 본 발명의 동결 건조 제제에 포함되는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 농도는 재구축 시 1 mg/mL 내지 150 mg/mL, 10 mg/mL 내지 120 mg/mL, 또는 10 mg/mL 내지 100 mg/mL이나, 이에 제한되지 않는다. 동결 건조 과정에서 예비 제형의 농도와 재구축 후 농도는 다를 수 있다.

【0075】

【0076】 본 발명의 동결 건조 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. 이러한 본 발명의 동결

건조 제제는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질, 완충 용액, 및 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

【0077】

【0078】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 융합된 형태로, 동결 건조, 재구축 또는 보관 과정에서 다양한 외부 요인 (pH, 온도, 삼투압, 안정화제 유무 등)에 의해 단백질의 구조가 변형되는 폴림(unfolding) 현상이 발생하고, 이로 인해 효소 활성 상실이 나타나며, α -갈락토시다제 A를 포함하는 제제의 약리 효과가 현저히 저해될 수 있다. 특히, α -갈락토시다제 A는 α -갈락토시다제 A를 이루는 두 개 도메인 중 하나의 도메인이 먼저 폴리고(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. 동결 건조 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. 따라서, 동결 건조 제제의 안정성을 위해서는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 폴림을 방지하는 조성을 포함하는 것이 중요하다.

【0079】 또한, 본 발명자들은 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제를 재구축할 때 천연형 회수율을 높이기 위해서는 제제의 pH 조건 및 당류(당 또는 당알코올) 포함 여부가 중요한 것을 규명하고, 본 발명을 완성하였

다. 본 발명의 동결 건조 제제는 장기간 보관에서도 융합 단백질의 구조 및 활성을 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 회수율이 높아 환자의 치료에 보다 효과적이다.

【0080】 본 발명에 따른 동결 건조 제제의 구체적인 예시로서, α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 융합 단백질; 완충 용액; 및 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액, 보다 구체적인 예시로는, 10 내지 40 mg/ml 의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 및 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는, 동결 건조 제제를 들 수 있다.

【0081】 또한, 다른 예시로서, 10 내지 40 mg/ml 의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 동결 건조 제제를 들 수 있다.

【0082】 또 다른 예시로서, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 및 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 동결 건조 제제를 들 수 있다.

【0083】 또 다른 예시로서, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산; 및 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 동결 건조 제제를 들 수 있다.

【0084】 또 다른 예시로서, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 만니톨, 수크로스 또는 트레할로스; 1.0 내지

3.0%(w/v)의 세린; 및 0.001 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트 20을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 동결 건조 제제를 들 수 있다.

【0085】 또 다른 예시로서, 15내지 35 mg/ml의 융합 단백질; 5 내지 30 mM 히스티딘; 2.5 내지 10 mg/ml의 당 또는 당알코올; 0.001 내지 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 20; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 세린을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 동결 건조 제제를 들 수 있으나, 본 발명의 동결 건조 제제는 상기 예시에 국한되지 않는다.

【0086】

【0087】 본 발명에서 용어 "수용액"은 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함하면서 α -갈락토시다제 A 융합 단백질이 안정하게 저장되고 동결 건조 과정 및 재구축 시 안정성을 유지할 수 있도록 하는 물질을 의미한다. 특히, 상기 수용액은 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 안정화시키는 부형제를 포함하여, 동결 건조 과정 중 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 안정성에 부여하고, 보관 안정성을 지닌 동결 건조 제제를 제조할 수 있게 한다. 상기 안정화제는 완충 용액, 및 당류(당 또는 당알코올)을 포함할 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 추가로 아미노산, 비이온성 계면활성제, 보존제, 항산화제 등을 포함할 수 있다. α -갈락토시다제 A 융합 단백질과 같은 단백질에 있어서, 저장 안정성은 정확한 투여량을 보장하기 위해서 뿐만 아니라, α -갈락토시다제 A 융합 단백질에 대한 항원성 형태 물질의 잠재적인 생성을 억제하기 위해서 중요하다. 상기 수용액은 본 발명에서 "예비 제형"과 혼용될 수 있다.

【0088】

【0089】 동결 건조 제제에 첨가되는 재구축 용액의 부피 조절에 따라, α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 농도를 조절할 수 있으므로, 수용액에서 α -갈락토시다제 A 용합 단백질의 농도는 특별히 제한되는 것은 아니나, 상기 수용액은 약 10mg/mL 이상, 구체적으로 약 10mg/mL 내지 40mg/mL의 고농도 α -갈락토시다제 A 용합 단백질도 안정적으로 동결 건조할 수 있고, 재구축한 용액의 α -갈락토시다제 A 용합 단백질도 안정성을 유지시킬 수 있는 이점을 가진다.

【0090】 예를 들어, 본 발명의 수용액은 상기 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 약 10 내지 90 mg/ml, 약 10 내지 70 mg/ml, 약 10 내지 50 mg/ml, 약 10 내지 30 mg/ml, 약 15 내지 50 mg/ml, 약 15 내지 40 mg/ml, 약 15 내지 30 mg/ml, 약 20 내지 30 mg/ml, 또는 약 10 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml, 또는 30 mg/ml의 농도로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0091】 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.

【0092】 일반적으로 제제 내에 포함되는 단백질의 농도가 높을수록 제제의 안정성을 유지하기 어렵고 단백질 침전 등이 발생하는 문제가 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 본 발명에 따른 안정화제 조성을 포함하는 수용액을 동결 건조한 경우에는 고농도로 용합 단백질을 포함하더라도 동결 건조 및 재구축 과정에서 용합 단백질의 구조를 유지할 수 있고 침전이 발생하지 않을 수 있으며, 재구축시 높은 회수율을 나타내므로, 본 발명의 수용액은 고농도, 예를 들어 약 10 mg/ml 이

상, 약 15 mg/ml 이상, 약 20 mg/ml 이상의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 유효 성분으로 포함할 수 있다.

【0093】

【0094】 본 발명의 수용액에 포함되는 일 구성요소인 완충 용액(buffer)은 동결 건조 과정 또는 재구성 후 제형의 pH가 급격히 변화하지 않게 수용액의 pH를 유지시키는 역할을 하는 용액을 의미한다. 상기 수용액은 α -갈락토시다제 A 융합 단백질 및 안정화제의 용매로 이용될 수 있으며, α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 안정화시킬 수 있는 pH를 유지시킬 수 있는 한, 본 발명의 완충 용액으로 제한 없이 이용될 수 있다.

【0095】 수용액의 pH 값은 융합 단백질의 구조에 영향을 미치며, pH 6.5 내지 8.0의 범위에서 융합 단백질의 구조가 안정적으로 유지될 수 있다. 적정 pH 조건을 벗어날 경우, α -갈락토시다제 A가 면역글로불린 Fc 영역에 비해 먼저 풀려(unfolding) 구조적 안정성이 저해될 수 있으므로, pH를 적정 수준으로 유지하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 구조적 안정성을 도모하는 것이 중요하다.

【0096】 특히, 본 발명자들은 pH 6.5 이상인 수용액으로 제조된 동결 건조 제제를 용해할 경우, 이를 냉장 보관 하더라도 그 성상이 투명한 것을 확인하였으며, 천연형 회수율도 높은 것을 확인하였다.

【0097】 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 수용액 내의 완충물질(구연산과 그 염, 아세트산과 그 염, 히스티딘과 그 염, 인산과 그 염, 또는 이들의 조합)은 단백질 구조적 안정성을 위한 pH를 유지하는 데 충분한 분량의 농도로 포함될 수 있다.

【0098】 상기 수용액의 pH는 약 6.5 내지 8.0, 예컨대 약 pH 6.5 내지 7.8, 약 pH 6.5 내지 7.5, 약 pH 6.5 내지 7.0, 약 pH 6.5 내지 6.8, 또는 pH 약 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 또는 7.5일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0099】 상기 목표하는 pH가 될 수 있도록 완충 용액은 인산, 구연산, 아세트산, 히스티딘, 또는 이들의 염, 또는 이들의 혼합물을 약 5 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, 약 5 mM 내지 약 25 mM, 약 5 mM 내지 약 15 mM, 약 5 mM 내지 약 10 mM, 또는 약 6.67 mM으로 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0100】

【0101】 하나의 구체예로, 상기 완충 용액은 약 10 mM 히스티딘을 포함하고 약 pH 6.5 이상, 구체적으로 약 pH 6.5 내지 8.0, 약 pH 6.5 내지 7.5, 약 pH 6.5 내지 7.0, 또는 약 pH 6.5 내지 6.8일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0102】

【0103】 본 발명의 수용액에 포함되는 당류(당 또는 당알코올)은 동결 건조 혼합물 용해 시 α -갈락토시다제 A 융합 단백질의 회수율을 높이는데 중요한 역할을 한다. 본 발명자들은 모든 pH 조건에서 당류를 포함하는 제제에서 당류의 종류에 관계없이 α -갈락토시다제 A 융합 단백질천연형 회수율이 높은 것을 확인하였다. 따라서, 당 또는 당알코올을 포함하여 천연형 회수율을 높인 본 발명의 동결 건조 제제는 투여 시 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 적정한 용량을 투여될 수 있도록 하여 치료 효과를 높일 수 있다.

【0104】 상기 당은 단당류, 이당류, 다당류, 올리고당류 등을 말하며, 구체적인 예로는 만노스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 푸코스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 라피노스, 텍스트란, 또는 이들의 조합일 수 있다. 하나의 구체예로 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 상기 당은 수크로스 또는 트레할로스일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0105】

【0106】 상기 당알코올은 다수의 수산기를 포함하는 물질을 말하며, 당의 알데히드기 및/또는 케톤기 등이 알코올기로 치환된 물질을 포함하며, 다중 수산기를 포함하는 당류 등도 포함한다. 예컨대, 상기 당알코올은 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합일 수 있고, 구체적으로는 만니톨일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0107】 본 발명에 따른 수용액은 한 종류의 당류, 즉 당 또는 당알코올을 포함하거나, 또는 여러 종류의 당류를 조합하여 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0108】 상기 당알코올, 당, 또는 이들의 조합은 수용액에 약 1 내지 30 mg/ml, 약 1 내지 25 mg/ml, 약 2 내지 20 mg/ml, 약 2 내지 15 mg/ml, 약 2 내지 10 mg/ml, 약 2.5 내지 5 mg/ml, 또는 약 2.5 mg/ml 로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0109】

【0110】 본 발명에 따른 수용액은 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. 상기 아미노산은 α -갈락토시다제 A 융합 단백질에 구조적 안정성을 부여할 수 있다. 본 발명의 동결 건조 제제에 포함되는 아미노산은 세린, 아르기닌, 라이신, 트레오닌, 아스파라긴, 글루타민, 글라이신, 프롤린, 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 페닐알라닌 또는 이들의 조합일 수 있고, 구체적으로, 세린, 아르기닌, 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.

【0111】 본 발명의 수용액 전체 부피에 대하여 아미노산은 수용액 내에 약 1.0 내지 5.0 %(w/v), 약 1.0 내지 4.0 %(w/v), 약 1.0 내지 3.0 %(w/v), 약 1.4 내지 3.0 %(w/v), 약 2.1 내지 2.9 %(w/v), 또는 약 1.4 %(w/v), 약 2.1 %(w/v), 약 2.5 %(w/v), 약 2.9 %(w/v)로 존재할 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0112】

【0113】 본 발명에 따른 수용액은 비이온성 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 비이온성 계면활성제는 단백질 용액의 표면장력을 낮추어 재구축 후에 소수성 표면에 단백질이 흡착되거나 응집되는 것을 방지하여 주는 물질을 의미한다.

【0114】 본 발명에 사용될 수 있는 비이온성 계면활성제의 구체적인 예로는 폴리소르베이트(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.

【0115】 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.

【0116】 본 발명에서 상기 비이온성 계면활성제는 본 발명의 수용액 전체 부피에 대하여 약 0.1%(w/v) 이하, 예컨대 약 0.001 내지 약 0.1(w/v), 약 0.001 내지 약 0.1%(w/v), 약 0.01 내지 약 0.05%(w/v), 또는 약 0.001%(w/v), 약 0.0255%(w/v), 또는 약 0.05%(w/v)로 포함될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

【0117】

【0118】 본 발명에 따른 수용액은 등장화제를 추가로 포함하지 않을 수 있으며, 상기 등장화제는 염화나트륨일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 동결 건조 제제의 수용액은 등장화제를 포함하지 않음으로써 동결건조 시 붕괴온도를 등장화제를 포함했을 때보다 높게 설정하여 동결건조 공정 시간을 줄일 수 있고 삼투압을 낮출 수 있는 이점을 가질 수 있다. 본 발명자들은 등장화제를 포함하지 않는 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조했을 때 붕괴 현상이 발생하지 않는 것을 확인하였다.

【0119】

【0120】 본 발명에 따른 수용액은 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), 벤세스늄 클로라이드(benzethonium chloride)

ride) 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.

【0121】

【0122】 한편, 본 발명의 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액(예비 제형)에는 상기 설명한 완충 용액, 당알코올, 당, 아미노산, 비이온성 계면활성제, 및/또는 보존제 외에 본 발명의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업계에 공지되어 있는 기타의 성분 내지 물질들이 선택적으로 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0123】

【0124】 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액(예비 제형)의 구체적인 예로, 10 내지 40 mg/ml 의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 및 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0125】 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액(예비 제형)의 다른 구체적인 예로, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산을 포함하는 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0126】 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액(예비 제형)의 다른 구체적인 예로, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; 5 내지 30 mM 히스티딘을 포함하는 pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올; 0.001 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트 20; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 세린을 포함하는 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0127】 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액(예비 제형)의 다른 구체적인 예로, 10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질; 5 내지 30 mM 히스티딘을 포함하는 pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 1 내지 20 mg/ml의 수크로스, 트레할로스, 또는 만니톨; 0.001 내지 0.1%(w/v)의 폴리소르베이트 20; 및 1.0 내지 3.0%(w/v)의 세린을 포함하는 수용액일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0128】 또한, 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액 또는 동결 건조 제제는 추가로 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 등을 포함할 수 있고, 이러한 담체, 부형제는 비자연적으로 존재하는 것일 수 있다.

【0129】

【0130】 본 발명에 따른 동결 건조 제제는 1 내지 10 mL의 수용액, 구체적으로 5 내지 10mL 또는 4 내지 6mL의 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0131】 본 발명자들은 4 또는 6mL으로 수용액을 제조하고 동결 건조한 후, 이를 용해한 결과, 두 충전량에서 큰 차이는 없었으나, 6mL의 충전량에서 천연형 회수율이 좀 더 높은 것을 확인하였다.

【0132】

【0133】 본 발명의 동결 건조 제제를 제조하기 위한 수용액은 당업계에 알려진 적절한 동결 및 건조 조건으로 동결 및 건조될 수 있다. 상기 건조는 1차 공정으로 완료될 수도 있고, 또는 2차 이상의 여러 공정으로 완료될 수도 있다.

【0134】

【0135】 또한, 본 발명의 동결 건조 제제는 목적하는 복용량(dosage)을 고려하여 α -갈락토시다제 A 용합 단백질을 적정 농도로 포함시켜 예비 제형을 제조하여 동결 건조하고, 이를 다시 재구축하여 개체에 투여하기 적합하게 재구성하여 얻을 수 있다. 또한, 예비 제형을 회석하여 부피를 증가시켜 동결 건조하고, 재구성 시에는 동결 건조 당시의 부피에 비하여 작은 부피의 재구축 용액으로 회석할 수도 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 동결 건조 제제는 α -갈락토시다제 A 용합 단백질, 안정화제(완충 용액, 당, 당알코올 등)를 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 의미할 수 있고, 더 나아가 상기 동결 건조 제제가 재구축 용액으로 재구축된 제형도 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0136】

【0137】 또한, 본 발명에 따른 동결 건조 제제는 장기 보관 시에도 α -갈락토시다제 A 용합 단백질이 활성을 유지하면서 물리적 및/또는 화학적 안정성을 유지할 수 있어 우수한 장기 안정성을 가질 수 있다. 예를 들어, 장기간 냉장 조건(5℃) 또는 가혹 조건(40℃)에서도 성장, 함습도 및 천연형 회수율이 적정 수준에서 유지될 수 있다.

【0138】 구체적으로, 본 발명에 따른 동결 건조 제제는 2주 이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상, 12개월 이상, 18개월 이상, 24개월 이상의 기간

동안, 약 -80°C 내지 약 50°C 의 온도, 예를 들어, 약 2°C 내지 8°C , 약 5°C , 약 35°C , 약 40°C , 약 35°C 이상, 약 40°C 이상에서 보관되어도 안정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0139】

【0140】 동결 건조 제제의 안정성 확인은 약전 규격을 비롯한 당업계에서 공지된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 안정성의 확인을 위한 시험 항목과 기준은 당업자가 적절히 설정할 수 있으며, 구체적인 방법에 제한되지 않는다.

【0141】 예를 들어, 본 발명에 따른 동결 건조 제제는 장기 보관 시에도 3% 미만, 2% 미만 또는 1% 미만의 함습도를 나타내 품질 저하가 없고, SE-HPLC에서 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 97% 이상의 천연형 회수율을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0142】

【0143】 한편, 하기에서는 본 발명의 동결 건조 제제에 포함되는 유효성분인 α -갈락토시다제 A 융합 단백질에 대해 보다 구체적으로 설명한다.

【0144】

【0145】 본 발명의 동결 건조 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 -갈락토시다

제 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 동결 건조 제제는 이와 같은 융합 단백질에 추가로 안정화제를 포함한 예비 제형을 동결 건조 시킴으로써 융합 단백질에 우수한 안정성을 부여하여 장기간 보관에도 약리 효과를 잃지 않는 것일 수 있다.

【0146】 구체적으로, 본 발명의 융합 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 서열번호 5의 폴리뉴클레오타이드 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 W02019/125059 의 명세서가 참조 문헌으로서 포함된다.

【0147】

【0148】 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.

【0149】 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.

【0150】

【0151】 본 발명의 α -갈락토시다제 A(alpha 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)과 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 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. 본 발명에서, 상기 α -갈락토시다제 A는 천연형이거나 재조합 형태일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0152】 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.

【0153】 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.

【0154】 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 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다. 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

【0155】 상기 α -갈락토시다제 A 또는 이의 유도체의 서열 및 이를 코딩하는 염기서열의 정보는 NCBI 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

【0156】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 α -갈락토시다제 A가 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 형태로 형질전환체에서 발현시켜 제조할 수 있다.

【0157】

【0158】 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.

【0159】

【0160】 상기 펩타이드 링커는 1개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 예컨대 1개부터 1000개의 아미노산을 포함할 수 있으며, 당업계에 알려진 임의의 펩

타이드 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.

【0161】

【0162】 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.

【0163】 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 잔기 뿐만 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.

【0164】 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.

【0165】

【0166】 본 발명의 효소 융합단백질의 일 구성 요소(moiety)인 면역글로불린 Fc 영역은 단량체의 면역글로불린 Fc 영역이 이량체를 형성한 것일 수 있다.

【0167】 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 힌지 영역을 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.

【0168】 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.

【0169】 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.

【0170】 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.

【0171】

【0172】 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.

【0173】 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.

【0174】

【0175】 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.

【0176】 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.

【0177】 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 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제W0 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.

【0178】 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 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.

【0179】 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.

【0180】 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질 전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간 또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질을 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.

【0181】 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, Fc

에서 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.

【0182】 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.

【0183】

【0184】 한편, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 픽 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간기원이다.

【0185】 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 서열

번호 3의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 3의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0186】

【0187】 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.

【0188】

【0189】 본 발명의 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 구조일 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.

【0190】

【0191】 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.

【0192】 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.

【0193】 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-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

【0194】 또한, 본 발명의 용어, "용매화물"은 본 발명에 따른 α -갈락토시다제 A, 융합 단백질 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

【0195】

【0196】 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.

【0197】

【0198】 본 발명의 동결 건조 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.

【0199】 본 발명의 α -갈락토시다제 A 융합 단백질은 효소 대체 요법 (enzymatic replacement therapy, ERT)의 약물로서 사용될 수 있다. 상기 효소 대체 요법은 질환의 원인이 되는 결핍 또는 부족 효소를 보충함으로써, 저하된 효소 기능의 회복을 통해 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

【0200】 구체적으로, 본 발명의 동결 건조 제제는 α -갈락토시다제 A 결핍증의 예방, 치료, 또는 개선을 위해 사용될 수 있다. 상기 α -갈락토시다제 A 결핍증은 리소솜 효소인 α -갈락토시다제 A(α -Gal A)의 결핍으로 야기되는 리소솜 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.

【0201】 상기 파브리병은 리소좀 축적 질환 중 하나이며, 성염색체 열성으로 유전하며, X염색체가 불활성화되어 발생한다. α -갈락토시다제 A (alpha-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.

【0202】 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 융합 단백질 또는 이를 포함하는 동결 건조 제제의 투여로 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 본 발명에서 용어 "치료"는 융합 단백질 또는 이를 포함하는 동결 건조 제제의 투여로 목적하는 질환의 증세가 개선, 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

【0203】

【0204】 본 발명의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 동결 건조 제제는 파브리병의 예방 또는 치료를 위해 이용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0205】 또한, 본 발명의 동결 건조 제제는 피하 투여의 경로로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로는, 동결 건조 상태의 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 재구성하여 피하 투여에 적합하도록 제조한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0206】 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 재구성된 동결 건조 제제를 도입하는 것을 의미하며, 상기 동결 건조 제제의 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 동결 건조 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.

【0207】

【0208】 본 발명의 융합 단백질의 바람직한 전체 투여 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있고, 본 발명의 동결 건조 제제는 상기 용량을 적절히 투여할 수 있도록 제형화 된 것일 수 있고, 또는 상기 용량으로 투여될 수 있도록 재구성된 것일 수 있다. 그러나 상기 융합 단백질의 용량은 투여 경로 및 치료 횟수 뿐만 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 상기 본 발명의 동결 건조 제제의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

【0209】

【0210】 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 상기 동결 건조 제제의 제조방법을 제공한다.

【0211】 구체적으로, 상기 제조방법은 α -갈락토시다제 A 용합 단백질과 완충 용액, 및 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함할 수 있다.

【0212】 상기 수용액 또는 동결 건조 제제는 아미노산, 비이온성 계면활성제, 및 보존제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 성분을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

【0213】 수용액, 동결 건조 제제 및 이를 구성하는 요소들에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

【0214】 상기 방법은 α -갈락토시다제 A와 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 α -갈락토시다제 A 용합 단백질, 완충용액, 및 당 또는 당알코올을 포함하는 1 내지 10 mL의 수용액, 구체적으로 5 내지 10 mL의 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0215】

【0216】 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 상기 동결 건조 제제에 재구축 용액을 첨가하는 단계를 포함하는, 상기 동결 건조 제제를 재구축하는 방법을 제공한다.

【0217】 상기 수용액, 동결 건조 제제 및 재구축에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

【0218】 본 발명에서 용어, "재구축 용액"은 고체 상태의 동결 건조 제제에 첨가하여 재구축하는 용액을 의미한다. 이러한 재구축 용액의 예로는, 증류수(물)가 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

【0219】 상기 재구축된 제제는 개체에 투여하기 적합한 농도로 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 포함할 수 있고, 구체적으로, α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 10 내지 100mg/mL, 10 내지 90mg/mL, 10 내지 50mg/mL, 또는 10 내지 30mg/mL로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0220】 상기 재구축된 제제는 개체에 피하 투여하기 적합하도록 본 발명에 따른 동결 건조 제제를 재구축한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

【0221】

【0222】 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.

【0223】

【0224】 실시예 1: α -갈락토시다제 A 및 면역글로불린 Fc 영역의 융합 단백질 제조

【0225】

【0226】 천연형 알파-갈락토시다제 A (α -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.

【0227】

【0228】 구체적으로, 상기 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(서열번호 5)를 발현 벡터인 XOGC 벡터에 제한효소를 이용하여 삽입하여 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제작하였다.

【0229】

【0230】 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.

【0231】

【0232】 【표1】

	서열	서열번호
단백질	<u>MQLRNPELHL</u> <u>GCALALRFLA</u> <u>LVSWDIPGAR</u> <u>ALDNGLARTP</u> <u>TMGWLHWERF</u> <u>MCNLDCQEEP</u> <u>DSCISEKLFM</u> EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAQR DSEGRLQADP QRFPHGIRQL ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFE DWGVDLLKFD GCYCDLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DDDSWKSIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPQAKAL LQKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLGKGVCNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLLG <i>GGGSGGGGSG</i> <i>GGGSGGGGSG</i> <i>GGGSGGGGSP</i> PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLGLK	4

DNA	ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCTTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGGAAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTGATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCTGG GAGTTTGGG TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTGAT GGTGTACT GTGACAGTTT GAAAAATTG GCAGATGGTT ATAAGCA CAT GTCCTTGGC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTA TAT GTGGCC TTTCAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTAACCAAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGG GGTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTGG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACCTAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGCAAGCA AGGGTACCAG CTAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACCGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCAGTGTTC TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAGA CTTACTTGGC GCGGGAGGTT CAGGTGGTG TGGCTCTGGC GGTGAGGGT CGGGGGAGG CGGCTCTGA GGAGGGGGCT CCGTGGGGG AGGTAGCCCA CCATGCCCAG CACCTGAGTTCTCGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCAAAAACC AAGGACACC TCATGATCTC CCGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGCCAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGAGGA GCAGTTCCAA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGC CTCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACC TGCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGAGCCG GAGAA CAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAG TGA	5
-----	--	---

【0233】 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.

【0234】

【0235】 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.

【0236】

【0237】 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.

【0238】

【0239】 실시예 2: pH 변화에 따른 동결 건조 제제 성상 개선

【0240】

【0241】 실시예 2-1: 동결 건조 제제의 제조

【0242】

【0243】 pH와 비이온성 계면활성제 및 아미노산의 함량을 다양하게 조합한 여러 동결 건조 제제를 제조하고, 동결 건조 제제의 성상 및 용해 후 성상, SE-HPLC 분석을 수행하였다.

【0244】

【0245】 동결 건조 제제의 제조를 위해 하기 표 2의 조성을 갖는 제제의 용액을 글래스 바이알(20 mL)에 4.0 mL씩 분주하고, Rubber stopper로 반타전 후 동결 건조기(Freeze dryer, Lyostar 3, SP scientific) 선반 위에 로딩하였다. 이후, 하기 표 3과 같은 조건으로 동결 건조를 진행하였으며, 제조된 동결 건조 제제는 알루미늄 동결 건조 완료 후 알루미늄 캡 (Aluminum cap)으로 캡핑(capping)하였다.

【0246】

【0247】

【표2】

#	융합 단백질 (Fc-GLA (mg/mL))	완충 용액 (L-Histidine (mM))	아미노산 (L-Serine (%, (w/v)))	비이온성 계면활성제 (Polysorbate 20 (%, (w/v)))	pH
1	30	10	2.1	0.001	6.0
2	30	10	2.1	0.001	7.0
3	30	10	2.1	0.05	6.0
4	30	10	2.1	0.05	7.0
5-7	30	10	2.5	0.0255	6.5
8	30	10	2.9	0.001	6.0
9	30	10	2.9	0.001	7.0
10	30	10	2.9	0.05	6.0
11	30	10	2.9	0.05	7.0

【0248】

【표3】

	로딩	동결	1차 건조	2차 건조
온도 (℃)	5	-55	-25	25
변온 속도(℃/min)	0	0.33	0.33	0.25
유지 시간(min)	30	300	4500	1200
압력 (mTorr)	N/A	N/A	60	50

【0249】

【0250】 실시예 2-2: 동결건조 제제 용해 및 성상 확인

【0251】

【0252】 동결 건조 바이알을 실온에 30 분 간 정치하여 바이알 표면에 발생한 습기를 제거한 후 케이크(cake) 성상을 확인하였다.

【0253】 2 mL 주사기에 25G 바늘(1 inch 이상)을 끼우고 증류수를 2 mL 뽑은 후 동결 건조물이 들어 있는 바이알에 90도 방향으로 쏘았다. 바이알 내 진공이 유지되어 있어 증류수는 자동으로 투입되었다.

【0254】 증류수 투입이 끝나면 바늘과 주사기를 분리하여 바이알 내 잔여 진공을 제거한 다음 바늘을 뽑고 바이알을 5회 흔든 후 정치하여 동결건조 케이크가 용해될 때까지 기다렸다.

【0255】 용해가 완료된 바이알 내 용액의 성상을 확인한 다음 바이알을 냉장 조건에 3일간 정치한 후 다시 성상을 확인하였다.

【0256】

【0257】 실시예 2-3: 크기 배제 액체 크로마토그래피(Size exclusion liquid chromatography, SE-HPLC)

【0258】

【0259】 실시예 2-2에서 용해한 동결 건조물을 이동상 (1xPBS, Lonza)을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 후 0.2 um 시린지 필터(syringe filter)로 여과하고, 여과된 검체 200 μ L를 바이알 인서트(vial insert)에 주입 후 스크류탑 바이알(screw top vial)에 끼워서 준비한다.

【0260】 이후, 이동상을 펌프(pump)에 연결한 후, Waters e2695와 Waters 2489 기기(Waters)에 0.5mL/min 속도(flow rate)로 이동상을 흘려주며 분석 컬럼(TSKgel G3000SWXL, Tosoh)을 장착하고 0.5mL/min 속도로 이동상을 30분 이상 흘려

주어 검출 신호(detector signal)가 안정화 될 때까지 평형 (equilibrium) 시켰다. 오토샘플러(Autosampler)의 온도가 4℃로 떨어지면 검체를 샘플러에 꽂고 검체를 10 μ L 주입한 뒤, 이동상으로 35분 동안 흘려주어 214nm에서 검출 피크(detection peak)를 확인하였다. PC의 Empower Pro software를 이용하여 분석을 수행하였다.

【0261】

【0262】 실시예 2-4: pH 변화에 따른 동결 건조 제제 성상 및 천연형 회수율 비교

【0263】

【0264】 먼저, 상기 실시예 2-2에서 제조된 동결 건조 제제의 케이크 성상을 비교한 결과, 모든 조건에서 심각한 붕괴 현상은 나타나지 않았고 적합한 성상을 나타내었다(도 1).

【0265】 용해 직후 성상은 모든 조건에서 투명한 성상을 나타내었으나 냉장 조건에서 3일간 정치한 후 성상은 pH가 낮을수록 혼탁해짐을 확인하였다(도 1). 구체적으로, pH 6.5 이상인 동결 건조 제제가 용해 후 투명한 성상을 나타내는 것을 확인하였다.

【0266】

【0267】 또한, 제조된 동결 건조 제제에서 천연형 회수율을 크기 배제 크로마토그래피로 확인한 결과, pH가 낮을수록 천연형 회수율이 낮음을 확인하였다(도 2). 구체적으로, pH 6.5 이상인 동결 건조 제제의 천연형 회수율이 높은 것을 확인하였다. 여기에서 천연형은 상기 실시예 1-1에서 제조한 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 의미한다.

【0268】

【0269】 상기에서 확인한 pH 변화에 따른 동결 건조 제제의 성상 및 천연형 회수율을 비교한 결과를 정리하면 하기 표 3과 같다.

【0270】

【0271】 【표4】

#	동결 건조물 cake 성상	용해 직후 성상	용해 후 냉장 3일 경과 후 성상	천연형 회수율 (%)
1	우수(elegant)	투명함	매우 혼탁함	96.5
2	우수(elegant)	투명함	투명함	97.8
3	우수(elegant)	투명함	혼탁함	95.3
4	우수(elegant)	투명함	투명함	98.0
5-7	우수(elegant)	투명함	투명함	96.1
8	우수(elegant)	투명함	매우 혼탁함	92.4
9	우수(elegant)	투명함	투명함	95.7
10	우수(elegant)	투명함	약간 혼탁함	87.8
11	우수(elegant)	투명함	투명함	90.5

【0272】

【0273】 실시예 3: pH, 충전량 변경 및 당류 스크리닝(sugar screening)을 통한 천연형 회수율 개선 조건 확인

【0274】

【0275】 실시예 3-1: 동결 건조 제제의 제조

【0276】

【0277】 상기 실시예 2에서 pH 6.5 이상인 제제에서 용해 후 성상이 개선됨을 확인한 후 천연형 회수율을 높일 목적으로, 최종 원액의 완충 용액, 아미노산, 비이온성 계면활성제, 충전량 변경 및 3 가지 종류의 당류(수크로스, 트레할로스, 만니톨)를 첨가하여 여러 동결 건조 제제를 제조한 후 크기 배제 크로마토그래피 분석을 수행하였다.

【0278】

【0279】 하기 표 5의 조성을 갖는 제제의 용액을 글래스 바이알(20 mL)에 4 mL 또는 6 mL씩 분주하고, rubber stopper로 반타전 후 동결 건조기(Freeze dryer, Lyostar 3, SP scientific) 선반 위에 로딩하였다. 이후, 하기 표 6과 같은 조건으로 동결 건조를 진행하고, 제조된 동결 건조 제제는 알루미늄 동결 건조 완료 후 알루미늄 캡 (Aluminum cap)으로 캡핑(capping)하였다.

【0280】

【0281】

【표5】

#	pH	완충 용액 (L-Histidine (mM))	융합 단백질 (Fc-GLA (mg/mL))	당류	충전량 (mL)	아미노산 (L-Serine (% (w/v)))	비이온성 계면 활성제 (Polysorbate 20 (% (w/v)))
1	6.5	6.67	20	Sucrose 10 mg/ mL	6	1.4	0.017
2		6.67		Trehalose 10 mg/mL			
3		6.67		Mannitol 10 mg/mL			
4		6.67		-			
5	6.8	6.67	20	Sucrose 10 mg/ mL	6	1.4	0.017
6		6.67		Trehalose 10 mg/mL			
7		6.67		Mannitol 10 mg/mL			
8				-			
10	6.5	10	30	Sucrose 15 mg/ mL	4	2.1	0.025
12		10		Trehalose 15 mg/mL			
14		10		Mannitol 15 mg/mL			
16		10		-			
18	6.8	10	30	Sucrose 15 mg/ mL	4	2.1	0.025

20	10	Trehalose 15 mg/mL		
22	10	Mannitol 15 mg/mL		
24	10	-		

【0282】 【표6】

	로딩	동결	1차 건조	2차 건조
온도 (℃)	5	-55	-25	25
변온 속도(℃/min)	0	0.33	0.33	0.25
유지 시간(min)	30	300	4500	1200
압력 (mTorr)	N/A	N/A	60	50

【0283】

【0284】 실시예 3-2: 동결건조 제제 용해 및 성상 확인

【0285】

【0286】 상기 실시예 3-1에서 제조한 동결 건조 바이알을 실온에 30 분 간 정치하여 바이알 표면에 발생한 습기를 제거한 후 케이크(cake) 성상을 확인하였다.

【0287】 2 mL 주사기에 25G 바늘(1 inch 이상)을 끼우고 증류수를 2 mL 뽑은 후 동결 건조물이 들어 있는 바이알에 90도 방향으로 콧았다. 바이알 내 진공이 유지되어 있어 증류수는 자동으로 투입되었다.

【0288】 증류수 투입이 끝나면 바늘과 주사기를 분리하여 바이알 내 잔여 진공을 제거한 다음 바늘을 뽑고 바이알을 5회 흔든 후 정치하여 동결건조 케이크가 용해될 때까지 기다렸다.

【0289】

【0290】 실시예 3-3: 크기 배제 액체 크로마토그래피(Size exclusion liquid chromatography, SE-HPLC)

【0291】

【0292】 실시예 3-2에서 용해한 동결 건조물을 이동상 (1xPBS, Lonza)을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 후 0.2 um syringe filter로 여과하고, 여과된 검체 200 μ L를 바이알 인서트(vial insert)에 주입 후 스크류탑 바이알(screw top vial)에 끼워서 준비한다.

【0293】 이후, 이동상을 펌프(pump)에 연결한 후, Waters e2695와 Waters 2489 기기(Waters)에 0.5 mL/min 속도(flow rate)로 이동상을 흘려주며 분석 컬럼 (TSKgel G3000SWXL, Tosoh)을 장착하고 0.5 mL/min 속도로 이동상을 30분 이상 흘려주어 검출 신호(detector signal)가 안정화 될 때까지 평형 (equilibrium) 시켰다. 오토샘플러(Autosampler)의 온도가 4℃로 떨어지면 검체를 샘플러에 꽂고 검체를 10 μ L 주입한 뒤, 이동상으로 35분 동안 흘려주어 214nm에서 검출 피크(detection peak)를 확인하였다. PC의 Empower Pro software를 이용하여 분석을 수행하였다.

【0294】

【0295】 실시예 3-4: pH, 충전량 변경 및 당류 종류에 따른 천연형 회수율 개선 조건 확인

【0296】

【0297】 먼저, 상기 실시예 3-2에서 제조된 동결 건조 제제의 케이크 성상을 비교한 결과, 모든 조건에서 심각한 붕괴 현상은 나타나지 않았다(도 3 및 도 4).

【0298】

【0299】 제조된 동결 건조 제제에서 천연형 회수율을 크기 배제 크로마토그래피로 확인한 결과, 3 종의 당류가 포함된 조건에서는 pH와 무관하게 최종 원액 대비 천연형의 비율이 거의 감소하지 않았으나 당류가 포함되지 않은 모든 조건에서는 최종원액 대비 천연형의 비율이 감소함을 확인하였다(도 5, 도 6).

【0300】 이는, 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제에서 당류를 포함할 경우 구체적인 당류의 종류와 상관 없이 천연형 회수율이 우수한 것을 시사한다.

【0301】

【0302】 또한, 최종 원액의 충전량을 비교했을 때는 6 mL을 충전한 조건에서 천연형의 회수율이 높았다(도 5 및 도 6).

【0303】

【0304】 실시예 4: 천연형 회수율 개선을 위한 수크로스(백당) 최적 농도 조건 확인

【0305】

【0306】 실시예 4-1: 동결 건조 제제의 제조

【0307】

【0308】 pH 6.8 조건에서 당류를 포함했을 때 천연형 회수율이 우수한 것을 확인한 후, 당류의 대표적인 예인 수크로스(백당)의 첨가량을 조절하여 여러 동결 건조 제제를 제조한 후 크기 배제 크로마토그래피 분석을 수행하였다.

【0309】

【0310】 하기 표 7의 조성을 갖는 제제의 용액을 글래스 바이알(20 mL)에 6 mL씩 분주하고, rubber stopper로 반타전 후 동결 건조기(Freeze dryer, Lyostar 3, SP scientific) 선반 위에 로딩하였다. 이후, 하기 표 7과 같은 조건으로 동결 건조를 진행하고, 제조된 동결 건조 제제는 알루미늄 동결 건조 완료 후 알루미늄 캡 (Aluminum cap)으로 캡핑(capping)하였다.

【0311】

【0312】 【표7】

#	pH	완충 용액 (L-Histidine (mM))	융합 단백질 (Fc-GLA (mg/mL))	백당(mg/mL)	충전량(mL)	아미노산 (L-Serine (%, (w/v)))	비이온성 계면활성제 (Polysorbate 20 (%, (w/v)))
1	6.8	6.67	20	0	6	1.4	0.017
2		6.67		2.5			
3		6.67		5			
4		6.67		10			

【0313】 【표8】

	로딩	동결	1차 건조	2차 건조
온도 (℃)	5	-55	-25	25
변온 속도(℃/min)	0	0.33	0.33	0.25
유지 시간(min)	30	300	2500	1200
압력 (mTorr)	N/A	N/A	60	50

【0314】

【0315】 실시예 4-2: 동결건조 제제 용해 및 성상 확인

【0316】

【0317】 동결 건조 바이알을 실온에 30 분 간 정치하여 바이알 표면에 발생한 습기를 제거한 후 케이크 성상을 확인하였다.

【0318】 2 mL 주사기에 25G 바늘(1 inch 이상)을 끼우고 증류수를 2 mL 뽑은 후 동결 건조물이 들어 있는 바이알에 90도 방향으로 꽂았다. 바이알 내 진공이 유지되어 있어 증류수는 자동으로 투입되었다.

【0319】 증류수 투입이 끝나면 바늘과 주사기를 분리하여 바이알 내 잔여 진공을 제거한 다음 바늘을 뽑고 바이알을 5회 흔든 후 정치하여 동결건조 케이크가 용해될 때까지 기다렸다.

【0320】

【0321】 실시예 4-3: 크기 배제 액체 크로마토그래피(Size exclusion liquid chromatography, SE-HPLC)

【0322】

【0323】 실시예 4-2에서 용해한 동결 건조물을 이동상 (1xPBS, Lonza)을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 후 0.2 um syringe filter로 여과하고, 여과된 검체 200 μ L를 바이알 인서트(vial insert)에 주입 후 스크류탑 바이알(screw top vial)에 끼워서 준비한다.

【0324】 이후, 이동상을 펌프(pump)에 연결한 후, Waters e2695와 Waters 2489 기기(Waters)에 0.5 mL/min 속도(flow rate)로 이동상을 흘려주며 분석 컬럼(TSKgel G3000SWXL, Tosoh)을 장착하고 0.5 mL/min 속도로 이동상을 30분 이상 흘려주어 검출 신호(detector signal)가 안정화 될 때까지 평형 (equilibrium) 시켰다. 오토샘플러(Autosampler)의 온도가 4℃로 떨어지면 검체를 샘플러에 꽂고 검체를 10 μ L 주입한 뒤, 이동상으로 35분 동안 흘려주어 214nm에서 검출 피크(detec

tion peak)를 확인하였다. PC의 Empower Pro software를 이용하여 분석을 수행하였다.

【0325】

【0326】 실시예 4-4: 천연형 회수율 개선을 위한 백당 최적 농도 조건 확인

【0327】

【0328】 먼저, 상기 실시예 4-2에서 제조된 동결 건조 제제의 케이크 성상을 비교한 결과, 모든 조건에서 심각한 붕괴 현상은 나타나지 않았다(도 7).

【0329】 제조된 동결 건조 제제에서 천연형 회수율을 크기 배제 크로마토그래피로 확인한 결과, 2.5 mg/mL 농도의 백당이 첨가된 조건(#2)에서 최종원액 대비 천연형의 비율 감소가 가장 적음을 확인하였다(도 8).

【0330】

【0331】 실시예 5: 최적 제형의 동결 건조 제제에 대한 장기 보관 안정성 평가

【0332】

【0333】 실시예 5-1: 동결 건조 제제의 제조

【0334】

【0335】 앞선 실시예를 통해 도출된 천연형 회수 최적 조건을 고려하여 최적 제형의 동결 건조 제제를 제조한 후 냉장($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) 조건에서 보관하면서 일정 주기로 크기 배제 크로마토그래피 분석을 수행하였다.

【0336】

【0337】 구체적으로, 하기 표 9의 조성을 갖는 제제의 용액을 글래스 바이알 (20 mL)에 6 mL씩 분주하고, rubber stopper로 반타전 후 동결 건조기(Freeze dryer, Lyostar 3, SP scientific) 선반 위에 로딩하였다. 이후, 하기 표 10과 같은 조건으로 동결 건조를 진행하고, 제조된 동결 건조 제제는 알루미늄 동결 건조 완료 후 알루미늄 캡 (Aluminum cap)으로 캡핑(capping)하였다.

【0338】

【0339】 【표9】

#	pH	완충 용액 (L-Histidine (mM))	융합 단백질 (Fc-GLA (mg/ mL))	백당(mg/mL)	아미노산 (L-Serine (% (w/v)))	비이온성 계면활성제 (Polysorbate 20 (%, (w/v)))
1	6.8	6.67	22	2.5	1.4	0.017

【0340】 【표10】

	로딩	동결	1차 건조	2차 건조
온도 (℃)	5	-55	-25	25
변온 속도(℃/min)	0	0.33	0.33	0.25
유지 시간(min)	30	300	2500	1200
압력 (mTorr)	N/A	N/A	60	50

【0341】

【0342】 실시예 5-2: 동결건조 제제 용해 및 성상 확인

【0343】

【0344】 동결 건조 바이알을 실온에 30 분 간 정치하여 바이알 표면에 발생한 습기를 제거한 후 케이크 성상을 확인하였다.

【0345】 2 mL 주사기에 25G 바늘(1 inch 이상)을 끼우고 증류수를 2 mL 뽑은 후 동결 건조물이 들어 있는 바이알에 90도 방향으로 콧았다. 바이알 내 진공이 유지되어 있어 증류수는 자동으로 투입되었다.

【0346】 증류수 투입이 끝나면 바늘과 주사기를 분리하여 바이알 내 잔여 진공을 제거한 다음 바늘을 뽑고 바이알을 5회 흔든 후 정치하여 동결건조 케이크가 용해될 때까지 기다렸다.

【0347】

【0348】 실시예 5-3: 함습도(Moisture content)

【0349】

【0350】 1 조건 당 3 바이알씩 동결 건조 바이알을 습도 40% 이하로 관리되는 함습도 분석실에 한 시간 이상 정치하였다. 대조군(Blank)으로 사용할 885 KF Thermoprep 전용 바이알과 cap도 3 set 준비하였다.

【0351】 바이알 내 동결 건조 케이크를 스페츨러를 이용하여 최대한 잘게 부순 후 영점 맞춘 885 KF Thermoprep 전용 바이알에 옮겨 담고 무게를 측정한 후 capping 하였다. 대조군 바이알은 별도의 칭량 없이 capping 한다. 이후 준비된 바이알을 대조군-검체 순으로 auto-sampler에 넣었다.

【0352】 831 KF Coulometer Remote Controller를 이용하여 대조군 3회, 검체 당 3회 측정하도록 프로그래밍한다. 885 Compact Oven에 분석할 총 검체 수를 입력한 후 분석을 진행하였다.

【0353】

【0354】 실시예 5-4: 크기 배제 액체 크로마토그래피(Size exclusion liquid chromatography, SE-HPLC)

【0355】

【0356】 상기 실시예 5-2에서 용해한 동결 건조물을 이동상 (1xPBS, Lonza)을 이용하여 1 mg/mL로 희석한 후 0.2 μ m 시린지 필터(syringe filter)로 여과하고, 여과된 검체 200 μ L를 바이알 인서트(vial insert)에 주입 후 스크류탑 바이알(screw top vial)에 끼워서 준비한다.

【0357】 이후, 이동상을 펌프(pump)에 연결한 후, Waters e2695와 Waters 2489 기기(Waters)에 0.5 mL/min 속도(flow rate)로 이동상을 흘려주며 분석 컬럼(TSKgel G3000SWXL, Tosoh)을 장착하고 0.5 mL/min 속도로 이동상을 30분 이상 흘려주어 검출 신호(detector signal)가 안정화 될 때까지 평형 (equilibrium) 시켰다. 오토샘플러(Autosampler)의 온도가 4℃로 떨어지면 검체를 샘플러에 꽂고 검체를 10 μ L 주입한 뒤, 이동상으로 35분 동안 흘려주어 214nm에서 검출 피크(detection peak)를 확인하였다. PC의 Empower Pro software를 이용하여 분석을 수행하였다.

【0358】

【0359】 실시예 5-5: 최적 제형의 동결 건조 제제에 대한 장기 보관 안정성 평가

【0360】

【0361】 상기 실시예 5-1에서 제조된 동결 건조 제제의 성상 및 함습도를 분석한 결과, 냉장($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) 조건 에서 6 개월 경과한 후에도 케이크 성상이나 용해 후 성상이 투명하게 유지됨을 확인하였고 함습도 또한 1.0 %로 유지되어 보관 용기의 기밀도가 유지됨을 확인하였다(도 9).

【0362】 제조된 동결 건조 제제를 냉장($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) 조건에서 보관하면서 3개월, 6개월 경과 시점에서 천연형 회수율을 크기 배제 크로마토그래피로 확인한 결과, 6개월 경과한 후에도 0 개월 대비 천연형의 비율이 거의 감소하지 않고 유지됨을 확인하였다(도 10).

【0363】

【0364】 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 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.

【0365】

【0366】

【0367】

【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

【청구범위】

【청구항 1】

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

10 내지 40 mg/ml의 융합 단백질;

pH 6.5 내지 8.0의 완충 용액; 및

1 내지 20 mg/ml의 당 또는 당알코올을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는, 동결 건조 제제.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 당은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 락토스, 말토스, 수크로스, 트레할로스, 또는 이들의 조합인 동결 건조 제제.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 당알코올은 만니톨, 소르비톨, 또는 이들의 조합인 동결 건조 제제.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 수용액은 1.0 내지 3.0%(w/v)의 아미노산을 추가로 포함하는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 아미노산은 세린, 아르기닌, 트레오닌, 글루타민, 글리신, 알라닌 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 수용액은 0.001 내지 0.1%(w/v)의 비이온성 계면활성제를 추가로 포함하는 것인, 동결 건조 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, 동결 건조 제제.

【청구항 8】

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

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 완충 용액은 5 내지 30 mM 히스티딘을 포함하는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 동결 건조 제제는 1 내지 10 mL의 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 11】

제1항에 있어서, 상기 수용액은 등장화제를 추가로 포함하지 않는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 12】

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

【청구항 13】

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

【청구항 14】

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

【청구항 15】

제1항에 있어서, 상기 동결 건조 제제는

15 내지 35 mg/ml의 융합 단백질;

5 내지 30 mM 히스티딘;

2.5 내지 10 mg/ml의 당 또는 당알코올;

0.001 내지 0.05%(w/v)의 폴리소르베이트 20; 및

1.0 내지 3.0%(w/v)의 세린을 포함하는 수용액을 동결 건조한 혼합물을 포함하는 것인, 동결 건조 제제.

【청구항 16】

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

【청구항 17】

i) α -갈락토시다제 A와 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 α -갈락토시다제 A 융합 단백질, ii) 완충용액, 및 iii) 당 또는 당알코올을 함유하는 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 동결 건조 제제의 제조 방법.

【청구항 18】

제17항에 있어서, 상기 방법은 i) α -갈락토시다제 A와 면역글로불린 Fc 영역이 결합된 α -갈락토시다제 A 융합 단백질, ii) 완충용액, 및 iii) 당 또는 당알코올을 포함하는 1 내지 10 mL의 수용액을 동결 건조하는 단계를 포함하는, 동결 건조 제제.

【청구항 19】

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 동결 건조 제제에 재구축 용액을 첨가하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 동결 건조 제제를 재구축하는 방법.

【청구항 20】

제19항에 있어서, 상기 재구축 용액은 증류수인 것인 방법.

【청구항 21】

제19항에 있어서, 상기 방법으로 재구축된 제제는 α -갈락토시다제 A 융합 단백질을 10 내지 100mg/mL 농도로 포함하는 것인 방법.

【요약서】

【요약】

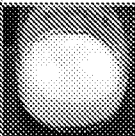
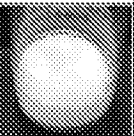
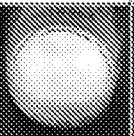
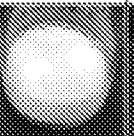
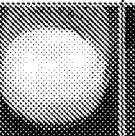
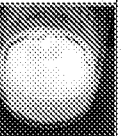
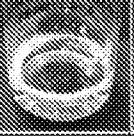
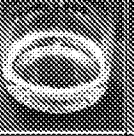
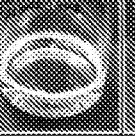
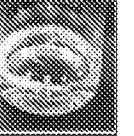
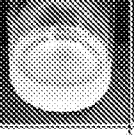
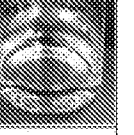
본 발명은 α -갈락토시다제 A의 융합 단백질을 포함하는 동결 건조 제제 및
이의 제조방법에 관한 것이다.

【대표도】

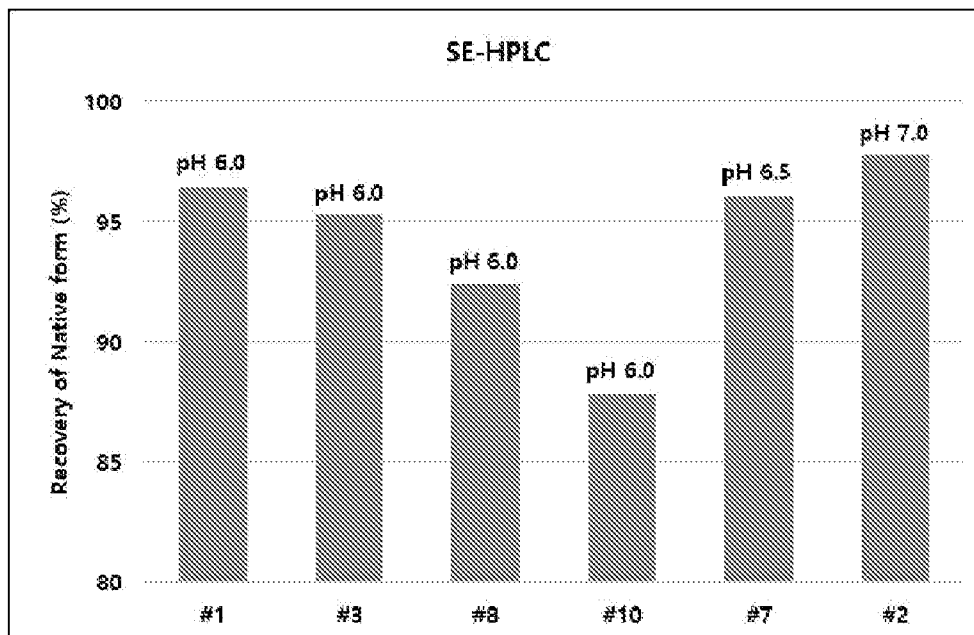
도 3

【도면】

【도 1】

Composition	#1	#3	#8	#10	#7	#2
pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.5	7.0
PS 20 (%)	0.001	0.05	0.001	0.05	0.0255	0.001
L-Serine (%)	2.1	2.1	2.9	2.9	2.5	2.1
성상 (cake)						
성상 (용해 직후)						
성상 (용해 후 냉장 3일)						
SEC (%Native)	96.5	95.3	92.4	87.8	96.1	97.8

【도 2】



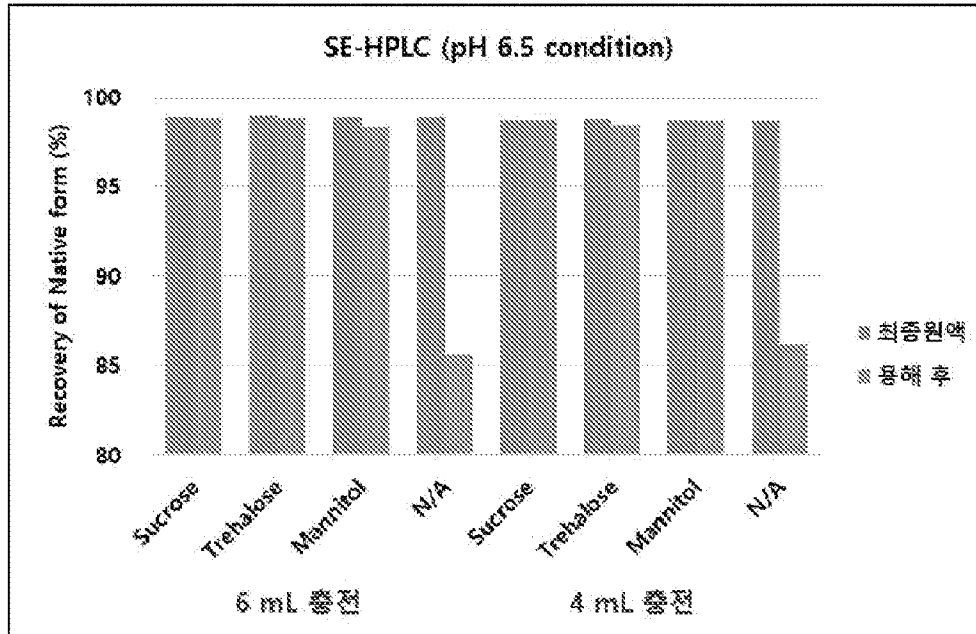
【도 3】

Composition	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.8	6.8	6.8	6.8
PS 20 (%)	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
L-Serine (%)	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Sugar	Sucrose 1%	Trehalose 1%	Mannitol 1%	N/A	Sucrose 1%	Trehalose 1%	Mannitol 1%	N/A
성상 (Cake)								

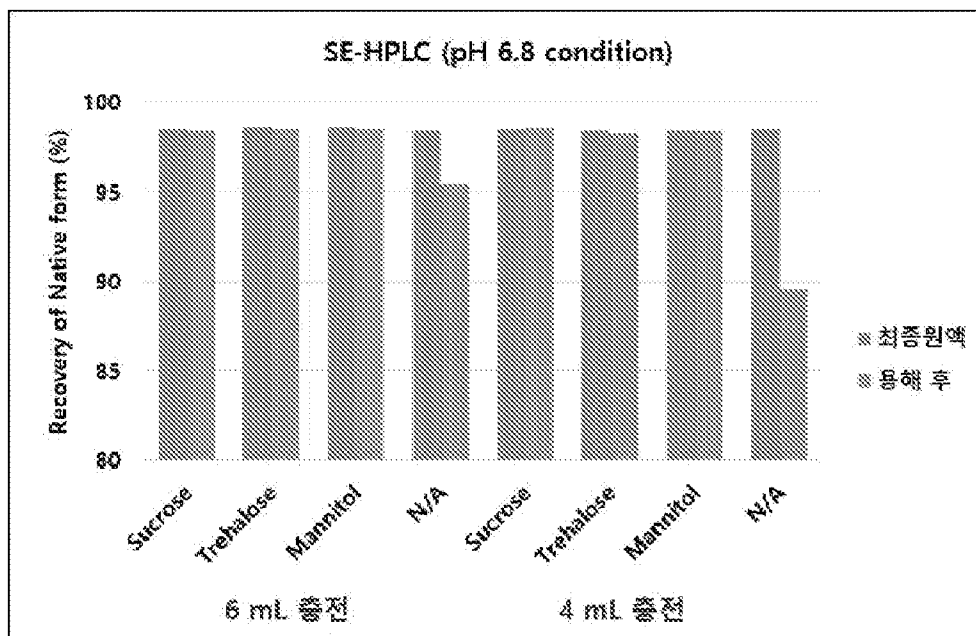
【도 4】

Composition	#10	#12	#14	#16	#18	#20	#22	#24
pH	6.5	6.5	6.5	6.5	6.8	6.8	6.8	6.8
PS 20 (%)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
L-Serine (%)	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Sugar	Sucrose 1.5%	Trehalose 1.5%	Mannitol 1.5%	N/A	Sucrose 1.5%	Trehalose 1.5%	Mannitol 1.5%	N/A
성상 (Cake)								

【도 5】



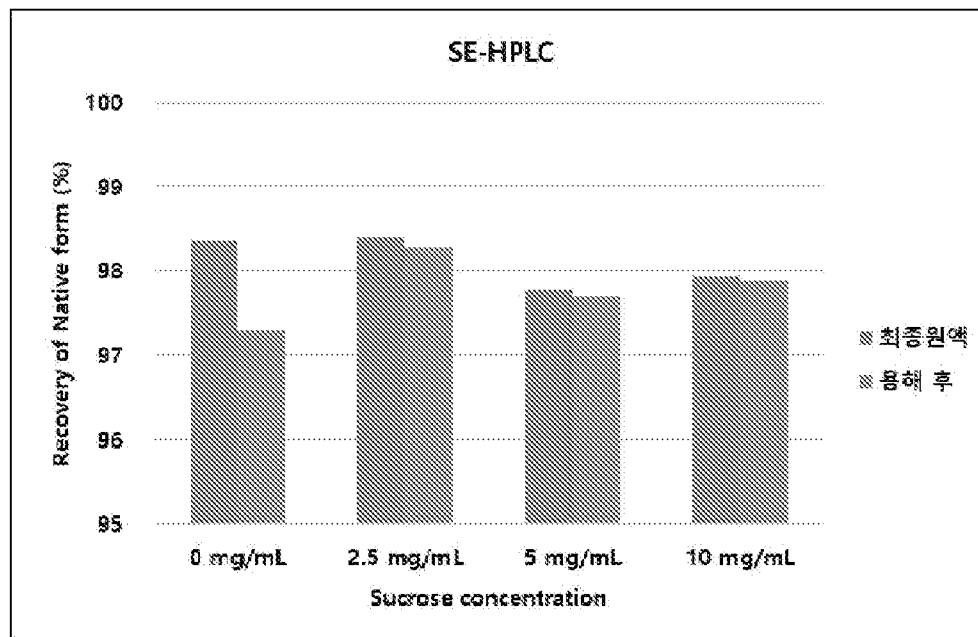
【도 6】



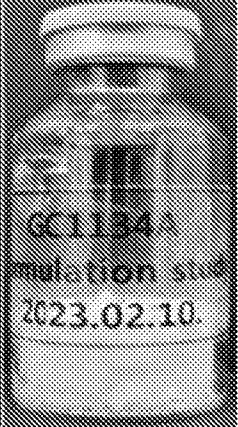
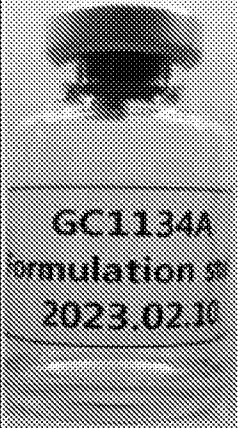
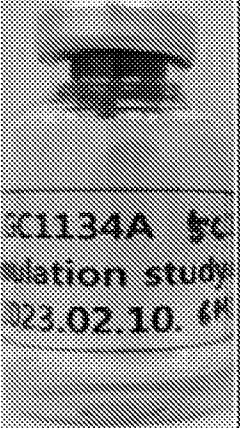
【도 7】

Composition	#1	#2	#3	#4
pH	6.8	6.8	6.8	6.8
PS 20 (%)	0.017	0.017	0.017	0.017
L-Serine (%)	1.4	1.4	1.4	1.4
Sucrose (%)	0	0.25	0.5	1.0
성상 (Cake)				

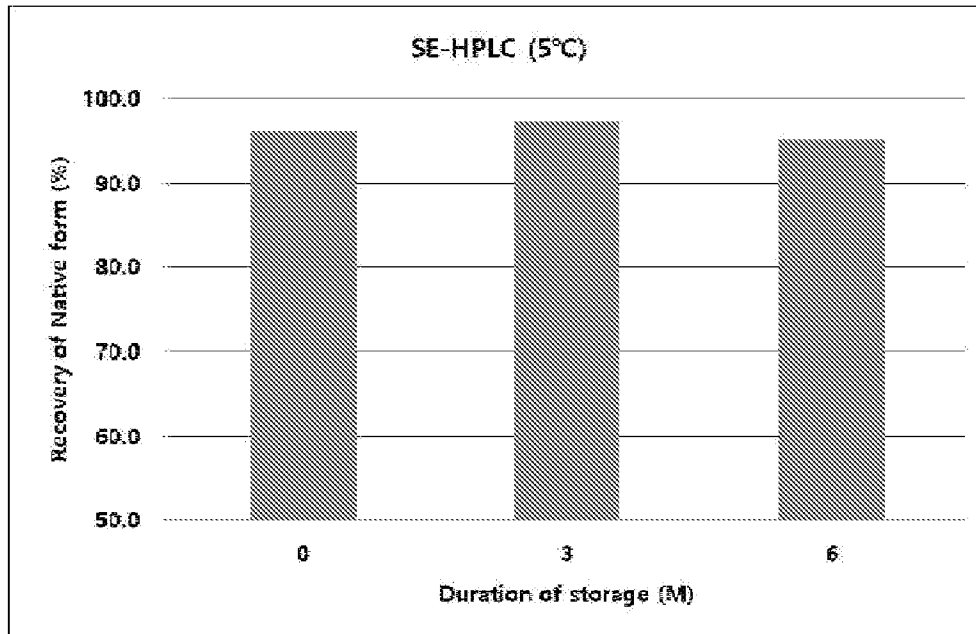
【도 8】



【도 9】

시험 항목	보관 온도	0 개월	6 개월
성상 (cake)	5±3℃		
성상 (용해 후)			
합습도 (%)		0.7	1.0

【도 10】



서열목록

1	서열목록 정보	
1-1	파일명	KPA231047-KR_SEQ.xml
1-2	DTD 버전	V1_3
1-3	소프트웨어 이름	WIPO Sequence
1-4	소프트웨어 버전	2.2.0
1-5	생성일자	2023-09-12
2	일반 정보	
2-1	현재 출원 번호: 특허청 코드	
2-2	현재 출원 번호: 출원번호	
2-3	현재 출원 번호: 출원일자	
2-4	현재 출원 번호: 출원인 관리번호	KPA231047-KR
2-5	우선권주장의 기초가 되는 출원 중 최초 출원: 특허청 코드	
2-6	우선권주장의 기초가 되는 출원 중 최초 출원: 출원번호	
2-7	우선권주장의 기초가 되는 출원 중 최초 출원: 출원일자	
2-8en	출원인 명칭	HANMI PHARM. CO., LTD.
2-8en	출원인 명칭: 영문 명칭	
2-9	발명자 이름	
2-9en	발명자 이름: 영문 명칭	
2-10en	발명의 명칭	Novel lyophilized formulation comprising a fusion protein including α -galactosidase A
2-11	서열식별번호의 수	5
3-1	서열	
3-1-1	서열식별번호	1
3-1-2	서열 타입	AA
3-1-3	길이	429
3-1-4-1	특징 위치/한정자	source 1..429 mol_type=protein organism=Homo sapiens
3-1-5	잔기	MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR ALDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDCQEEL 60 DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAQPR DSEGRQLQADP QRFPHGIRQL 120 ANYVHSKGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLNL 180 ADGYKHMSLA LNRTRGSIVY SCEWPLYMWP FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DDDSWKSIK 240 SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDLVI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL 300 RHISPAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG 360 GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT 420 MQMSLKDLL 429
3-2	서열	
3-2-1	서열식별번호	2
3-2-2	서열 타입	AA

서열목록

3-2-3	길이	30
3-2-4-1	특징 위치/한정자	REGION 1..30 note=peptide linker
3-2-4-2	특징 위치/한정자	source 1..30 mol_type=protein organism=synthetic construct
3-2-5	간기	GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS 30
3-3	서열	
3-3-1	서열 식별번호	3
3-3-2	서열 타입	AA
3-3-3	길이	221
3-3-4-1	특징 위치/한정자	REGION 1..221 note=Fc varinat
3-3-4-2	특징 위치/한정자	source 1..221 mol_type=protein organism=synthetic construct
3-3-5	간기	PPCPAPEFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN 60 AKTKPREEQF QSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP 120 QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGGSFFL 180 YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG K 221
3-4	서열	
3-4-1	서열 식별번호	4
3-4-2	서열 타입	AA
3-4-3	길이	680
3-4-4-1	특징 위치/한정자	REGION 1..680 note=alpha galactosidase-Fc fusion protein
3-4-4-2	특징 위치/한정자	source 1..680 mol_type=protein organism=synthetic construct
3-4-5	간기	MQLRNPELHL GCALALRFLA LVSWDIPGAR ALDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDCQEEP 60 DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC IDDCWMAQPR DSEGRQLQADP QRFPHGIRQL 120 ANYVHSGGLK LGIYADVGNK TCAGFPGSFG YYDIDAQTFA DWGVDDLKFD GCYCDSLNL 180 ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP FQKENYTEIR QYCNHWRNFA DDDSWKSIK 240 SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMLEI GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL 300 RHISPAKAL LQDKDVIAIN QDPLGKQGYQ LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG 360

서열목록

	GPRSYTIAVA SLGKGVACNP ACFITQLLPV KRKLGFYEWY SRLRSHINPT GTVLLQLENT 420
	MQMSLKDLLG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 480
	KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT 540
	VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 600
	LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 660
	MHEALHNYHT QKSLSLSLGK 680
3-5	서열
3-5-1	서열 식별번호
3-5-2	서열 타입
3-5-3	길이
3-5-4-1	특징 위치/한정자
	misc_feature 1..2043
	note=alpha galactosidase-Fc fusion protein
3-5-4-2	특징 위치/한정자
	source 1..2043
	mol_type=other DNA
	organism=synthetic construct
3-5-5	간기
	atgcagctga ggaaccacaga actacatctg ggctgcgcgc ttgcgcttcg cttcctggcc 60
	ctcgtttccct gggacatccc tggggctaga gcactggaca atggattggc aaggacgcct 120
	accatgggct ggctgcactg ggagcgcttc atgtgcaacc ttgactgccg ggaagagcca 180
	gattcctgca tcagtgcagaa gctcttcatg gagatggcag agctcatggt ctcagaaggc 240
	tggaaggatg caggttatga gtacctctgc attgatgact gttggatggc tccccaaaga 300
	gattcagaag gcagacttca ggcagaccct cagcgctttc ctcatgggat tcgccagcta 360
	gctaattatg ttccacagcaa aggactgaag ctagggattt atgcagatgt tggaaataaa 420
	acctgcgcag gcttccctgg gagttttgga tactacgaca ttgatgcccc gacctttgct 480
	gactggggag tagatctgct aaaattttgat ggttggtact gtgacagttt ggaaaaatttg 540
	gcagatggtt ataagcacat gtccctggcc ctgaatagga ctggcagaag cattgtgtac 600
	tcctgtgagt ggcctcttta tatgtggccc ttccaaaagc ccaattatac agaaatccga 660
	cagtactgca atcactggcg aaattttgct gacattgatg attcctggaa aagtataaag 720
	agtatcttgg actggacatc ttttaaccag gagagaattg ttgatgttgc tggaccaggg 780
	ggttggaatg acccagatat gttagtgatt ggcaactttg gcctcagctg gaatcagcaa 840
	gtaactcaga tggccctctg ggcctatcatg gctgctcctt tattcatgtc taatgacctc 900
	cgacacatca gccctcaagc caaagctctc cttcaggata aggacgtaat tgccatcaat 960
	caggaccctt tgggcaagca agggtaaccag cttagacagg gagacaactt tgaagtgtgg 1020
	gaacgacctc tctcaggctt agcctgggct gttagctatga taaaccggca ggagattggg 1080
	ggacctcgct cttataccat cgcagttgct tccttgggta aaggagtggc ctgtaatcct 1140
	gcctgcttca tcacacagct cctccctgtg aaaaggaagc tagggttcta tgaatggact 1200
	tcaagggttaa gaagtcacat aaatcccaca ggcactgttt tgcttcagct agaaaataca 1260
	atgcagatgt cattaaaaaga cttacttggc ggcggagggt cagggtgtgg tggtctggc 1320
	gggtggagggt cggggggagg cggctctgga ggagggggct ccggtggggg aggttagccca 1380
	ccatgccccag cacctgagtt cctgggggga ccatcagtc tctgttccc cccaaaaccc 1440
	aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1500
	caggaagacc ctgaggtcca gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1560
	aagacaaaagc cgcgggagga gcagttccaa agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1620
	gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctct caacaaaggc 1680
	ctcccatcct ccactgcagaa aaccatctcc aaagccaaag gccagccccc agaaccacag 1740
	gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc 1800
	ctgggtcaaa gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1860
	gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
	agcaggctaa ccgtggacaa gagcagggtg caggagggga acgtcttctc atgctccgtg 1980
	atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa 2040
	tga 2043