

NUEVA FORMULACIÓN LIOFILIZADA QUE CONTIENE UNA
PROTEÍNA DE FUSIÓN DE α -GALACTOSIDASA A

Ámbito técnico

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

Técnica anterior

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

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSD) son causadas por
15 defectos en los genes que codifican las enzimas de degradación de productos
de desecho de glicolípidos o polisacáridos en los lisosomas celulares, y la
actividad biológica de las enzimas lisosomales se reduce significativamente o
casi desaparece en las células y tejidos de individuos con enfermedades de
almacenamiento lisosomal. Tal deficiencia de enzimas degradantes provoca la
20 acumulación de sustancias en grandes cantidades sin degradación, lo que
finalmente causa problemas en las funciones celulares.

La enfermedad de Fabry, conocida como una de las enfermedades de almacenamiento lisosomal, es un tipo de trastorno metabólico congénito de los glicolípidos (glicoesfingolípidos) que resulta de una actividad deficiente o insuficiente de la alfa (α)-galactosidasa A, que es una hidrolasa presente en los
5 lisosomas. La enfermedad de Fabry, como enfermedad representativa de la deficiencia de α -galactosidasa A, es una enfermedad asociada al cromosoma X. Los sujetos típicos con enfermedad de Fabry generalmente tienen una actividad de α -galactosidasa A menor que 1 % y presentan un amplio intervalo de síntomas, que incluyen dolor intenso en las extremidades (acroparestesia),
10 hipersensibilidad al frío, alteraciones corneales y lenticulares, lesiones cutáneas (angiokeratoma), insuficiencia renal, enfermedades cardiovasculares, insuficiencia pulmonar, síntomas del sistema nervioso y accidentes cerebrovasculares.

La enfermedad de Fabry causa una acumulación progresiva de
15 globotriaosilceramida (Gb3) en la mayoría de los tejidos del cuerpo. La acumulación de Gb3 se encuentra principalmente en el endotelio vascular. Tal acumulación progresiva de Gb3 en el endotelio vascular provoca isquemia e infarto en órganos, tales como los riñones, el corazón o el cerebro.

La terapia de reemplazo enzimático (ERT) es un procedimiento
20 representativo para tratar las enfermedades de almacenamiento lisosomal, y se han realizado varios estudios relacionados (Frances M. Platt et al., J Cell Biol.

26 de noviembre de 2012; 199(5):723-34). Específicamente, las enfermedades de almacenamiento lisosomal son causadas por defectos genéticos en enzimas particulares, por lo que es esencial una terapia de reemplazo enzimático para las enzimas deficientes. La terapia de reemplazo enzimático es una terapia
5 estándar para las enfermedades de almacenamiento lisosomal y puede exhibir un efecto de alivio de los síntomas existentes o retrasar el progreso de las enfermedades mediante el reemplazo de las enzimas deficientes. Por lo tanto, se han realizado estudios sobre diversas formulaciones que incluyen la α -galactosidasa A, para evitar y tratar la deficiencia de α -galactosidasa A.

10 Sin embargo, la composición de una formulación para exhibir estabilidad varía significativamente dependiendo de la estructura, las propiedades fisicoquímicas, la dosificación, etc., de un ingrediente activo (por ejemplo, un fármaco proteico), y por lo tanto se requiere esencialmente el desarrollo de una composición particular adecuada para el ingrediente activo, y el desarrollo de
15 una formulación que contenga α -galactosidasa A es insuficiente. En particular, una formulación liofilizada que contiene una proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración elevada exhibe una estabilidad de almacenamiento significativamente baja debido a problemas tales como la precipitación de proteínas, por lo que las formulaciones liofilizadas convencionales contienen una
20 proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración de 5 mg/mL o menos. Sin embargo, es necesario desarrollar una formulación altamente estable que

contenga una proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración elevada para aumentar la eficacia.

Divulgación de la invención

Problema técnico

5 Además, el desarrollo de formulaciones liofilizadas que sean adecuadas para el almacenamiento a largo plazo y mantengan la estructura y la actividad de las proteínas es un reto debido a problemas tales como la pérdida de estructura o función de las proteínas durante la liofilización de los medicamentos proteicos. Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar una formulación
10 liofilizada capaz de aumentar la tasa de recuperación de proteínas y garantizar la estabilidad incluso durante el almacenamiento a largo plazo.

Solución al problema

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

15 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar la formulación liofilizada.

Todavía otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para reconstituir la formulación liofilizada.

Efectos ventajosos de la invención

20 La formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede almacenar de forma estable una proteína de fusión α -galactosidasa A durante

un largo periodo de tiempo y puede administrar a un paciente una dosificación apropiada de la proteína de fusión aumentando la tasa de recuperación en la reconstitución.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1 compara las apariencias de la torta de una formulación liofilizada inmediatamente después de la disolución y tres días después de la disolución de acuerdo con las condiciones de pH.

La FIG. 2 compara las tasas de recuperación de la forma nativa de la formulación liofilizada de acuerdo con las condiciones de pH.

10 Las FIGS. 3 y 4 comparan las apariencias de las formulaciones liofilizadas que contienen azúcar o alcohol de azúcar.

La FIG. 5 compara las tasas de recuperación de la forma nativa de la formulación liofilizada a pH 6,5 de acuerdo con la adición de azúcar o alcohol de azúcar.

15 La FIG. 6 compara la tasa de recuperación de la forma nativa de la formulación liofilizada a pH 6,8 de acuerdo con la adición de azúcar o alcohol de azúcar.

La FIG. 7 compara las apariencias de una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios de concentración de un azúcar (sacarosa).

20 La FIG. 8 compara las tasas de recuperación de la forma nativa de una formulación liofilizada de acuerdo con los cambios de concentración de un

azúcar (sacarosa).

La FIG. 9 examina la apariencia de una formulación liofilizada con una composición óptima bajo refrigeración durante 12 meses.

La FIG. 10 compara la tasa de recuperación de la forma nativa de una
5 formulación liofilizada a los 3, 6 y 12 meses.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una formulación liofilizada que contiene una proteína de fusión α -galactosidasa A.

En una realización, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla
10 obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina; un tampón; y un azúcar o alcohol de azúcar.

En otra realización, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una
15 proteína de fusión a una concentración de 1 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; y un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla obtenida mediante
20 la liofilización de una solución acuosa que contiene: la proteína de fusión a una concentración de 1 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar o

alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; y un aminoácido a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v).

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: la proteína de fusión a una
5 concentración de 1 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; y un tensioactivo no iónico a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v).

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación liofilizada puede incluir una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: la proteína de fusión a una
10 concentración de 1 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0 que contiene de 5 a 30 mM de histidina; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; polisorbato 20 a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v); y
15 serina a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v).

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el azúcar puede ser glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el alcohol de azúcar puede ser manitol, sorbitol o una combinación
20 de los mismos.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la solución acuosa puede contener además un aminoácido en una concentración del 1,0 al 3,0 % (p/v).

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones
5 anteriores, el aminoácido puede seleccionarse del grupo que consiste en serina, arginina, treonina, glutamina, glicina, alanina y una combinación de los mismos.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la solución acuosa puede contener además un tensioactivo no iónico en una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v).

10 En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el tensioactivo no iónico puede seleccionarse del grupo que consiste en poloxámero 188, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80 y una combinación de los mismos.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones
15 anteriores, el tampón puede contener histidina o una sal de la misma, ácido cítrico o una sal del mismo, ácido acético o una sal del mismo, ácido fosfórico o una sal del mismo, o una combinación de los mismos.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el tampón puede contener de 5 a 30 mM de histidina.

20 En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la formulación liofilizada no puede contener además un agente

isotónico.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente isotónico puede ser cloruro de sodio.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones
5 anteriores, la α -galactosidasa A puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

10 En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína de fusión α -galactosidasa A puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la región Fc de inmunoglobulina puede derivarse de IgG4.

15 En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la región Fc de inmunoglobulina puede estar aglicosilada.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones anteriores, la proteína de fusión puede tener una estructura en la que dos moléculas de α -galactosidasa A están enlazadas a monómeros de una región Fc
20 de inmunoglobulina en forma dimérica, respectivamente.

En la formulación liofilizada de una cualquiera de las realizaciones

anteriores, la formulación liofilizada puede utilizarse para evitar o tratar la enfermedad de Fabry.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar la formulación liofilizada.

5 En una realización, el procedimiento de preparación puede incluir la liofilización de una solución acuosa que contenga: i) una proteína de fusión α -galactosidasa A en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina; ii) un tampón; y iii) un azúcar o alcohol de azúcar.

10 En otra realización, el procedimiento de preparación de una cualquiera de las realizaciones anteriores puede incluir mezclar además un aminoácido, un tensioactivo no iónico, un conservante o una combinación de los mismos con la solución acuosa.

15 En el procedimiento de preparación de una cualquiera de las realizaciones anteriores, el procedimiento puede incluir la liofilización de 1 a 10 mL de una solución acuosa que contiene al menos uno de una proteína, un tampón, un azúcar, un alcohol de azúcar, un aminoácido, un tensioactivo no iónico, un conservante o una combinación de los mismos.

20 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para reconstituir la formulación liofilizada, el procedimiento incluye añadir una solución de reconstitución a la formulación liofilizada.

En una realización, la solución de reconstitución puede ser agua destilada.

En otra realización, la formulación reconstituida puede contener una proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración de 10 a 100 mg/mL.

Modo para la invención

De aquí en adelante en la presente memoria, los contenidos detallados
5 para implementar la presente invención se describirán a continuación.

Cada descripción y realización divulgada en la presente solicitud también puede aplicarse a otras descripciones y realizaciones. Es decir, todas las combinaciones de los diversos elementos divulgados en la presente solicitud entran dentro del ámbito de la presente divulgación. Además, el ámbito de la
10 presente invención no está limitado por la descripción específica a continuación.

Además, un experto en la técnica reconocerá, o podrá determinar, mediante el uso de experimentos rutinarios, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Además, estos equivalentes están destinados a ser incluidos en la presente
15 invención.

A lo largo de la descripción de la presente memoria, se utilizan no solo los códigos típicos de una y tres letras para los aminoácidos naturales, sino también los códigos de tres letras generalmente permitidos para otros aminoácidos, tales como el ácido 2-aminoisobutírico (Aib), la N-metilglicina (Sar) y el ácido α -metilglutámico. Los aminoácidos mencionados en la presente memoria se
20 abrevian de acuerdo con las reglas de nomenclatura de IUPAC-IUB, de la

siguiente manera.

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

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

- 15 Específicamente, la presente invención se refiere a una formulación liofilizada que incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A y una región Fc de inmunoglobulina están enlazadas entre sí; un tampón; y un azúcar o un alcohol
- 20 de azúcar. La solución acuosa puede contener además un aminoácido, un tensioactivo no iónico, un conservante o una combinación de los mismos, pero

no se limita a ello.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "formulación liofilizada" se refiere a un fármaco formulado mediante liofilización, como forma de un producto farmacéutico. Específicamente, la proteína de fusión α -galactosidasa A puede liofilizarse junto con una sustancia, tal como un excipiente, utilizada para estabilizar la proteína de fusión y, por lo tanto, se presenta en estado sólido. Un componente contenido en la formulación liofilizada, además de la proteína de fusión α -galactosidasa A que exhibe eficacia farmacológica, puede utilizarse indistintamente con estabilizadores. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "estabilizador" se refiere a una sustancia que mantiene de forma estable los componentes de una formulación, tal como un ingrediente activo, durante un periodo de tiempo predeterminado.

En la presente invención, la formulación liofilizada es un concepto que incluye una sustancia liofilizada. La formulación liofilizada anterior se fabrica mediante un procedimiento de liofilización en forma de una formulación preliofilizada que contiene estabilizadores para estabilizar la proteína de fusión α -galactosidasa A y la proteína de fusión α -galactosidasa A. En la presente invención, la formulación liofilizada de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión α -galactosidasa A, y la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede estar contenida en un envase de un solo uso o en un

envase de múltiples usos, pero no se limita a ello. La formulación liofilizada de la presente invención tiene una composición capaz de estabilizar la proteína de fusión α -galactosidasa A durante el procedimiento de liofilización, e incluso mientras la formulación liofilizada se almacena y luego se reconstituye, se puede
5 mantener la estabilidad de la formulación y la formulación tiene una alta tasa de recuperación de la proteína de fusión α -galactosidasa A. Además, la formulación liofilizada de la presente invención puede mantener la estabilidad incluso cuando la proteína de fusión α -galactosidasa A está contenida en ella en una concentración elevada de 10 mg/mL a 40 mg/mL.

10 La formulación liofilizada que incluye la proteína de fusión α -galactosidasa A de acuerdo con la presente invención se almacena en un envase y, cuando es necesario, puede reconstituirse para su administración a un individuo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "reconstitución" se refiere al procedimiento de licuar (disolver) la sustancia liofilizada en estado
15 sólido, de tal manera que se pueda administrar la proteína de fusión α -galactosidasa A. En particular, la concentración de la proteína de fusión α -galactosidasa A incluida en la formulación liofilizada de la presente invención puede ser de 1 mg/mL a 150 mg/mL, de 10 mg/mL a 120 mg/mL, o de 10 mg/mL a 100 mg/mL tras la reconstitución, pero no se limita a ello. La concentración de
20 la preformulación durante un procedimiento de liofilización puede ser diferente de la que se obtiene después de la reconstitución.

La formulación liofilizada de la presente invención incluye estabilizadores capaces de estabilizar la estructura de la proteína de fusión, de modo que la eficacia farmacológica de la proteína de fusión α -galactosidasa A pueda mantenerse durante mucho tiempo, incluso durante un almacenamiento a largo
5 plazo. Tal formulación liofilizada de la presente invención incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene la proteína de fusión α -galactosidasa A, un tampón y un azúcar o alcohol de azúcar.

La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención se presenta en una forma en la que la α -galactosidasa A se fusiona con una región
10 Fc de inmunoglobulina. La proteína de fusión α -galactosidasa A sufre un desplegamiento, en el que la estructura de la proteína se deforma por diversos factores externos (por ejemplo, pH, temperatura, ósmosis y presencia o ausencia de estabilizadores) durante un procedimiento de liofilización, reconstitución o almacenamiento, lo que causa una pérdida de actividad enzimática, lo que da
15 como resultado un deterioro significativo de la eficacia farmacológica de la formulación que incluye α -galactosidasa. Particularmente, uno de los dos dominios que constituyen la α -galactosidasa A se despliega primero (para formar agregados solubles) y el otro dominio de la α -galactosidasa A y la región Fc de inmunoglobulina se despliegan secuencialmente, seguido de la formación de
20 agregados de orden superior y, finalmente, los dominios CH2 y CH3 de la región Fc de inmunoglobulina se despliegan (para formar agregados insolubles), lo que

da como resultados precipitados visibles a simple vista. Si la estructura de la proteína de fusión α -galactosidasa A no se mantiene debido al estrés que ocurre durante el almacenamiento de la formulación liofilizada, lo que da como resultado agregados solubles o agregados de orden superior, aumenta el riesgo de inmunogenicidad, lo que causa problemas de seguridad con la formulación. Por lo tanto, es importante incluir una composición que evite el despliegue de la proteína de fusión α -galactosidasa A, con el fin de garantizar la estabilidad de la formulación liofilizada.

Los presentes inventores establecieron que las condiciones de pH de una formulación y la inclusión o exclusión de azúcares (un azúcar o alcohol de azúcar) son importantes para aumentar la tasa de recuperación de una forma nativa cuando se reconstituye una formulación liofilizada que contiene una proteína de fusión α -galactosidasa A, y completaron la presente invención. La formulación liofilizada de la presente invención puede mantener la estructura y la actividad de la proteína de fusión durante el almacenamiento a largo plazo y alcanza una alta tasa de recuperación, por lo que es más eficaz en el tratamiento de pacientes.

Un ejemplo específico de la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una formulación liofilizada que incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina; un tampón; y un azúcar o alcohol de azúcar, más

específicamente, una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; y un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL.

Otro ejemplo puede ser una formulación liofilizada que incluye una mezcla
5 obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; y un aminoácido a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v).

Todavía otro ejemplo puede ser una formulación liofilizada que incluye
10 una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; y un tensioactivo no iónico a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v).

15 Todavía otro ejemplo puede ser una formulación liofilizada que incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; un aminoácido a una concentración de 1,0 a
20 3,0 % (p/v); y un tensioactivo no iónico a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v).

Todavía otro ejemplo puede ser una formulación liofilizada que incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; manitol, sacarosa o trehalosa a una
5 concentración de 1 a 20 mg/mL; serina a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v); y polisorbato 20 a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v).

Todavía otro ejemplo puede ser una formulación liofilizada que incluye una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión en una concentración de 15 a 35 mg/mL;
10 histidina en una concentración de 5 a 30 mM; un azúcar o alcohol de azúcar en una concentración de 2,5 a 10 mg/mL; polisorbato 20 en una concentración de 0,001 a 0,05 % (p/v); y serina en una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v), pero la formulación liofilizada de la presente invención no se limita a los ejemplos anteriores.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "solución acuosa" se refiere a una sustancia capaz de almacenar de forma estable la proteína de fusión α -galactosidasa A y mantener la estabilidad durante la liofilización y la reconstitución, al tiempo que contiene la proteína de fusión α -galactosidasa A. En particular, la solución acuosa contiene un excipiente para estabilizar la
20 proteína de fusión α -galactosidasa A, lo que confiere estabilidad a la proteína de fusión α -galactosidasa A durante la liofilización y permite la preparación de una

formulación liofilizada con estabilidad de almacenamiento. Los estabilizadores pueden incluir un tampón y azúcares (un azúcar o un alcohol de azúcar). Los estabilizadores pueden incluir además, pero no se limitan a, un aminoácido, un tensioactivo no iónico, un conservante, un antioxidante y similares. En proteínas
5 tales como la proteína de fusión α -galactosidasa A, la estabilidad de almacenamiento es importante no solo para una dosificación precisa, sino también para inhibir la posible producción de una sustancia antigénica contra la proteína de fusión α -galactosidasa A. La solución acuosa puede utilizarse indistintamente con "preformulación" en la presente invención. La formulación
10 liofilizada de la presente invención comprende una mezcla liofilizada de la solución acuosa que comprende la proteína de fusión α -galactosidasa A y estabilizadores (por ejemplo, tampón, azúcar, alcohol de azúcar, aminoácido, etc.).

La concentración de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede
15 controlarse ajustando el volumen de la solución de reconstitución añadida a la formulación liofilizada y, por lo tanto, la concentración de la proteína de fusión α -galactosidasa A en la solución acuosa no está particularmente limitada, pero la solución acuosa puede liofilizar de forma estable la proteína de fusión α -galactosidasa A a una concentración elevada de aproximadamente 10 mg/mL o
20 más, específicamente de aproximadamente 10 mg/mL a 40 mg/mL, y también puede mantener la estabilidad de la proteína de fusión α -galactosidasa A en una

solución reconstituida.

Por ejemplo, la solución acuosa de la presente invención puede contener la proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración de aproximadamente 10 a 90 mg/mL, aproximadamente 10 a 70 mg/mL, aproximadamente 10 a 50 mg/mL, aproximadamente 10 a 30 mg/mL, 5 aproximadamente 15 a 50 mg/mL, aproximadamente 15 a 40 mg/mL, aproximadamente 15 a 30 mg/mL, aproximadamente 20 a 30 mg/mL, aproximadamente 10 mg/mL, 20 mg/mL, 22 mg/mL o 30 mg/mL, pero no se limita a ello.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo que abarca $\pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$, $\pm 0,01$ y similares, e incluye todos los valores en el intervalo equivalentes o similares a los indicados después de este término, pero no se limita a ellos.

Es bien sabido que aumentar la concentración de proteínas en una 15 formulación puede reducir la estabilidad y provocar la precipitación de las proteínas. Sin embargo, la solución acuosa que contiene estabilizadores de acuerdo con la presente invención, incluso cuando contiene la proteína de fusión en una concentración elevada, puede mantener la estructura de la proteína de fusión durante la liofilización y la reconstitución, suprimir la aparición de 20 precipitados y lograr una alta tasa de recuperación tras la reconstitución. Por lo tanto, la solución acuosa de la presente invención puede contener, como

ingrediente activo, la proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración elevada, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 10 mg/mL o más, aproximadamente 15 mg/mL o más, o aproximadamente 20 mg/mL o más.

El tampón, como componente contenido en la solución acuosa de la presente invención, es una solución que sirve para mantener el pH de la solución acuosa con el fin de evitar un cambio rápido en el pH de la formulación durante la liofilización o después de la reconstitución. La solución acuosa puede utilizarse como disolvente para la proteína de fusión α -galactosidasa A y los estabilizadores, y cualquier solución acuosa puede utilizarse como tampón de la presente invención sin limitación, siempre que la solución acuosa pueda mantener el nivel de pH en el que se estabiliza la proteína de fusión α -galactosidasa A.

El valor del pH de la solución acuosa afecta a la estructura de la proteína de fusión, y la estructura de la proteína de fusión puede mantenerse estable a un pH de 6,5 a 8,0. Si el pH se encuentra fuera del intervalo apropiado, la α -galactosidasa A se despliega antes que la región Fc de inmunoglobulina, lo que resulta en una estabilidad estructural deficiente. Por lo tanto, es importante mantener el pH en un nivel apropiado para garantizar la estabilidad estructural de la proteína de fusión α -galactosidasa A.

En particular, los presentes inventores identificaron que cuando se disolvía una formulación liofilizada preparada a partir de una solución acuosa con

un pH de 6,5 o superior, la apariencia era transparente incluso cuando se refrigeraba, y la tasa de recuperación de la forma nativa también era alta.

Algunos ejemplos de tampones pueden incluir el ácido fosfórico y sus sales alcalinas conjugadas (por ejemplo, un fosfato, tal como fosfato de sodio, fosfato de potasio o sales de hidrógeno o dihidrógeno de los mismos), ácido cítrico y sus sales (por ejemplo, citrato de sodio), ácido acético y sus sales (por ejemplo, acetato de sodio), histidina y sus sales, y mezclas de estos como tampones, pero no se limitan a ello. Por ejemplo, el tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en un tampón de citrato (por ejemplo, tampón de citrato de sodio), un tampón de acetato (por ejemplo, tampón de acetato de sodio), un tampón de fosfato (por ejemplo, tampón de fosfato de sodio), un tampón de histidina y una combinación de los mismos, y el tampón o las sustancias tampón en la solución acuosa (ácido cítrico y una sal del mismo, ácido acético y una sal del mismo, histidina y una sal de la misma, ácido fosfórico y una sal del mismo, o una combinación de los mismos) pueden estar contenidos en una concentración suficiente para mantener el pH para la estabilidad estructural de las proteínas.

El pH de la solución acuosa puede ser de aproximadamente 6,5 a 8,0, por ejemplo, de aproximadamente 6,5 a 7,8, de aproximadamente 6,5 a 7,5, de aproximadamente 6,5 a 7,0, de aproximadamente 6,5 a 6,8, o un pH de aproximadamente 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5, pero no está

particularmente limitado a ello.

Para lograr el pH objetivo, el tampón puede incluir ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido acético, histidina o una sal de los mismos, o una mezcla de los mismos, en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 80 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 8 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, o de aproximadamente 6,67 mM, pero no está particularmente limitado a ello.

En una realización específica, el tampón puede incluir aproximadamente 10 mM de histidina y tener un pH de aproximadamente 6,5 o superior, específicamente, un pH de aproximadamente 6,5 a 8,0, un pH de aproximadamente 6,5 a 7,5, un pH de aproximadamente 6,5 a 7,0, o un pH de aproximadamente 6,5 a 6,8, pero no se limita a ello.

Los azúcares (un azúcar o alcohol de azúcar) contenidos en la solución acuosa de la presente invención desempeñan un papel crucial en el aumento de la tasa de recuperación de la proteína de fusión α -galactosidasa A cuando se disuelve una mezcla liofilizada. Los presentes inventores identificaron que la tasa de recuperación de la proteína de fusión α -galactosidasa A nativa era alta

independientemente del tipo de azúcar en las formulaciones que incluyen azúcares bajo todas las condiciones de pH. Por lo tanto, la formulación liofilizada de la presente invención, que alcanza una alta tasa de recuperación de la forma nativa al contener un azúcar o un alcohol de azúcar, puede mejorar el efecto terapéutico al permitir la administración de la proteína de fusión α -galactosidasa A en una dosis apropiada.

El azúcar se refiere a un monosacárido, un disacárido, un polisacárido o un oligosacárido, y ejemplos de los mismos pueden ser manosa, glucosa, fructosa, galactosa, fucosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, dextrano o una combinación de los mismos. En una realización específica, el azúcar puede ser glucosa, fructosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa o una combinación de las mismas, pero no se limita a ello. Por ejemplo, el azúcar puede ser sacarosa o trehalosa, pero no se limita particularmente a ello.

El alcohol de azúcar se refiere a una sustancia que contiene una pluralidad de grupos hidroxilo e incluye una sustancia en la que un grupo aldehído y/o un grupo cetona de un azúcar se sustituye con un grupo alcohol, e incluye sacáridos que contienen múltiples grupos hidroxilo. Por ejemplo, el alcohol de azúcar puede ser manitol, sorbitol o una combinación de los mismos, y específicamente puede ser manitol, pero no se limita a ello.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede contener un tipo de azúcar, es decir, un azúcar o un alcohol de azúcar, o puede contener

una combinación de varios tipos de azúcares, pero no se limita a ello.

El alcohol de azúcar, el azúcar o una combinación de los mismos pueden estar presentes en la solución acuosa, en una concentración de aproximadamente 1 a 30 mg/mL, aproximadamente 1 a 25 mg/mL, aproximadamente 2 a 20 mg/mL, aproximadamente 2 a 15 mg/mL, 5 aproximadamente 2 a 10 mg/mL, aproximadamente 2,5 a 5 mg/mL, o aproximadamente 2,5 mg/mL, pero no se limita particularmente a ello.

La solución acuosa de la presente invención puede contener además un aminoácido. El aminoácido puede conferir estabilidad estructural a la proteína de fusión α -galactosidasa A. El aminoácido contenido en la formulación liofilizada de la presente invención puede seleccionarse entre serina, arginina, 10 lisina, treonina, asparagina, glutamina, glicina, prolina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o una combinación de los mismos y, específicamente, puede seleccionarse del grupo que consiste en serina, arginina, treonina, glutamina, 15 glicina, alanina y una combinación de las mismas, pero no se limita a ello. En una realización específica, el aminoácido puede ser serina, pero no se limita a ello.

En relación con el volumen total de la solución acuosa de la presente invención, el aminoácido puede estar presente en la solución acuosa en una 20 cantidad de aproximadamente 1,0 a 5,0 % (p/v), aproximadamente 1,0 a 4,0 % (p/v), aproximadamente 1,0 a 3,0 % (p/v), aproximadamente 1,4 a 3,0 % (p/v),

aproximadamente 2,1 a 2,9 % (p/v), aproximadamente 1,4 % (p/v), aproximadamente 2,1 % (p/v), aproximadamente 2,5 % (p/v) o aproximadamente 2,9 % (p/v), pero no está particularmente limitado a ello.

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

Ejemplos específicos de tensioactivos no iónicos disponibles en la
10 presente invención pueden incluir un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán), polisorbato 40 (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitán), polisorbato 60 (monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán), polisorbato 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitán); en el que el número 20 que sigue al polioxietileno indica el número total de grupos
15 oxietileno ($-(CH_2CH_2O)-$)), poloxámero (copolímero de PEO-PPO-PEO; en el que PEO: poli(óxido de etileno) y PPO: poli(óxido de propileno)), polietileno-polipropilenglicol, un compuesto de polioxietileno (por ejemplo, estearato de polioxietileno, éter alquílico de polioxietileno (alquilo: C1-C30), éter monoalílico de polioxietileno, copolímero de polioxietileno alquilfenilo (alquilo: C1-C30), etc.),
20 y dodecilsulfato de sodio (SDS), y similares, o un ejemplo de los mismos puede ser polisorbato o poloxámero, y estas sustancias pueden utilizarse solas o en

combinación de una o más de las mismas.

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

5 En la presente invención, el tensioactivo no iónico puede estar contenido en la solución acuosa de la presente invención, en relación con el volumen total de la solución acuosa, en una concentración de aproximadamente 0,1 % (p/v) o menos, por ejemplo, aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 % (p/v), aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,1 % (p/v), aproximadamente 0,01
10 a aproximadamente 0,05 % (p/v), aproximadamente 0,001 % (p/v), aproximadamente 0,0255 % (p/v) o aproximadamente 0,05 % (p/v), pero no está particularmente limitado a ello.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede no contener además un agente isotónico, y el agente isotónico puede ser cloruro de
15 sodio, pero no se limita a ello. La solución acuosa de la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención no contiene un agente isotónico y, por lo tanto, permite establecer una temperatura de colapso más alta durante la liofilización, lo que reduce el tiempo del procedimiento de liofilización y disminuye la presión osmótica. Los presentes inventores identificaron que no ocurrió
20 ningún colapso cuando se preparó la formulación liofilizada que no contenía ningún agente isotónico de acuerdo con la presente invención.

La solución acuosa de acuerdo con la presente invención puede contener además un conservante. El conservante es una sustancia que mitiga sustancialmente la acción de bacterias u hongos en la formulación y es un compuesto contenido en la formulación para facilitar la producción de preparaciones multidosis. Ejemplos de posibles conservantes pueden incluir cloruro de octadecildimetil-bencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruro de alquilbencildimetilamonio en la que un grupo alquilo es un compuesto de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes pueden incluir alcoholes aromáticos, tales como fenol, butilo o alcohol bencílico; alquilparabenos, tales como parabenos de alquilo, tal como parabeno de metilo o propilo; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol, pero no se limitan a ello. La concentración del conservante puede ser de 0,001 % (p/v) a 1,0 % (p/v), pero no se limita a ello.

Por otra parte, la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de la presente invención puede contener además, de forma opcional, otros componentes o sustancias conocidos en la técnica, además del tampón, alcohol de azúcar, azúcar, aminoácido, tensioactivo no iónico y/o conservante descritos anteriormente, dentro de intervalos que no perjudiquen los efectos ventajosos de la presente invención, pero no se limita a ello.

Un ejemplo específico de la solución acuosa (preformulación) para

preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; y un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL, pero no se limita a
5 ello.

Otro ejemplo específico de la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0; un azúcar
10 o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; un tensioactivo no iónico a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v); y un aminoácido a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v), pero no se limita a ello.

Otro ejemplo específico de la solución acuosa (preformulación) para preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede
15 ser una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0 que contenga de 5 a 30 mM de histidina; un azúcar o alcohol de azúcar a una concentración de 1 a 20 mg/mL; polisorbato 20 en una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v); y serina en una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v), pero no se limita
20 a ello.

Otro ejemplo específico de la solución acuosa (preformulación) para

preparar la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser una solución acuosa que contiene: una proteína de fusión a una concentración de 10 a 40 mg/mL; un tampón con un pH de 6,5 a 8,0 que contiene de 5 a 30 mM de histidina; sacarosa, trehalosa o manitol a una concentración de
5 1 a 20 mg/mL; polisorbato 20 a una concentración de 0,001 a 0,1 % (p/v); y serina a una concentración de 1,0 a 3,0 % (p/v), pero no se limita a ello.

Además, la solución acuosa para preparar la formulación liofilizada o la formulación liofilizada puede contener además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente y similares, y tal vehículo o excipiente puede ser de
10 origen no natural.

La formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede incluir una mezcla obtenida mediante la liofilización de 1 a 10 mL de una solución acuosa y, específicamente, de 5 a 10 mL o de 4 a 6 mL de una solución acuosa, pero no se limita a ello.

15 Los presentes inventores prepararon 4 o 6 mL de una solución acuosa, seguida de liofilización y posterior disolución, y como resultado, identificaron que la tasa de recuperación de la forma nativa era mayor para una cantidad de carga de 6 mL, sin diferencias significativas entre las dos cantidades de carga.

La solución acuosa para preparar la formulación liofilizada de la presente
20 invención puede congelarse y secarse bajo condiciones de congelación y secado apropiadas conocidas en la técnica. El secado puede completarse en un

procedimiento primario o mediante varios procedimientos, tales como procedimientos secundarios o superiores.

La formulación liofilizada de la presente invención puede obtenerse preparando una preformulación que incluya la proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración apropiada considerando la dosis deseada, liofilizando la preformulación y luego reconstituyendo de nuevo el producto resultante para que sea adecuado para su administración a un paciente. La preformulación puede diluirse para aumentar el volumen, liofilizarse y luego reconstituirse con un volumen menor de solución de reconstitución en comparación con el volumen durante la reconstitución, pero no se limita a ello. En la presente invención, la formulación liofilizada puede ser una mezcla obtenida mediante la liofilización de una solución acuosa que contiene la proteína de fusión α -galactosidasa A y estabilizadores (por ejemplo, un tampón, un azúcar, un alcohol de azúcar, etc.), y además puede ser una formulación reconstituida obtenida mediante la reconstitución de la formulación liofilizada utilizando una solución de reconstitución, pero no se limita a ello.

La formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede mantener la estabilidad física y/o química de la proteína de fusión α -galactosidasa A, al tiempo que mantiene su actividad incluso durante un almacenamiento a largo plazo, lo que garantiza una excelente estabilidad a largo plazo. Por ejemplo, la apariencia, el contenido de humedad y la tasa de

recuperación de una forma nativa pueden mantenerse en niveles apropiados incluso bajo condiciones de refrigeración prolongada (5 °C) o en condiciones adversas (40 °C).

5 Específicamente, la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención puede ser estable durante un periodo de tiempo de 2 semanas o más, 1 mes o más, 3 meses o más, 6 meses o más, 12 meses o más, 18 meses o más, o 24 meses o más, incluso a una temperatura de aproximadamente -80 °C a 50 °C, por ejemplo, aproximadamente 2 °C a 8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, 35 °C o superior, o
10 aproximadamente de 40 °C a 45 °C, pero no se limita a ello.

La estabilidad de la formulación liofilizada puede examinarse mediante un procedimiento conocido en la técnica, que incluye las especificaciones de la farmacopea, y los elementos y criterios de prueba para evaluar la estabilidad pueden ser establecidos apropiadamente por una persona experta en la técnica,
15 sin que el examen se limite a procedimientos específicos.

Por ejemplo, la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención permanece transparente en términos de apariencia como una torta o apariencia después de la disolución, incluso durante el almacenamiento a largo plazo, tiene un contenido de humedad menor que 5 %, menor que 4 %, menor
20 que 3 %, menor que 2 % o menor que 1 %, lo que da como resultado que no se produzca ningún deterioro en la calidad del producto, y muestra una tasa de

recuperación de una forma nativa del 85 % o más, 90 % o más, 95 % o más, o 97 % o más en SE-HPLC, pero no se limita a ello.

De aquí en adelante en la presente memoria, se describirá con más detalle la proteína de fusión α -galactosidasa A como ingrediente activo contenido en la
5 formulación liofilizada de la presente invención.

La proteína de fusión α -galactosidasa A contenida en la formulación liofilizada de la presente invención se refiere a una proteína de fusión en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina, y la proteína de fusión puede tener una forma en la que dos moléculas de α -
10 galactosidasa A están enlazadas a la región Fc de inmunoglobulina en forma dimérica a través de enlazadores. Específicamente, dos moléculas de α -galactosidasa A pueden enlazarse a los monómeros respectivos de la región Fc de inmunoglobulina en forma dimérica a través de enlazadores, respectivamente. Las dos moléculas de α -galactosidasa A pueden formar un dímero a través de
15 enlaces no covalentes, pero no se limitan a ello. La proteína de fusión de la presente invención tiene una mayor estabilidad de la α -galactosidasa A debido a la fusión de la región Fc de inmunoglobulina con la α -galactosidasa A, lo que le permite ejercer su eficacia farmacológica durante un largo periodo de tiempo en el cuerpo. La formulación liofilizada de la presente invención no pierde su
20 eficacia farmacológica a pesar del almacenamiento a largo plazo, ya que se liofiliza una preformulación que contiene estabilizadores además de la proteína

de fusión para conferir una excelente estabilidad a la proteína de fusión.

Específicamente, la proteína de fusión de la presente invención puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o puede estar codificado por la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 5, pero no se limita a ello. La
5 proteína de fusión de la presente invención puede ser un dímero formado por dos monómeros que incluyen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, pero no se limita a ello. Para la proteína de fusión de la presente invención, se incorpora como referencia la divulgación de WO 2019/125059.

Tal y como se utilizan en la presente memoria, los términos "proteína de
10 fusión en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina», "proteína de fusión α -galactosidasa A" y "proteína de fusión" pueden utilizarse indistintamente.

La proteína de fusión de la presente invención se expresa dentro de un transformante en una forma en la que la α -galactosidasa A está enlazada a la
15 región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador, de modo que la α -galactosidasa A forma un dímero a través de enlaces no covalentes cuando la región Fc de inmunoglobulina forma el dímero.

La α -galactosidasa A (alfa-galactosidasa A, α -Gal A, GLA) de la presente invención es una enzima presente en los lisosomas del bazo, el cerebro, el
20 hígado y similares, que hidroliza las fracciones α -galactosilo en los extremos de los glicolípidos y las glicoproteínas, y es una glicoproteína homodimérica. En

particular, se sabe que la α -galactosidasa A está implicada en la enfermedad de Fabry, que es una enfermedad de almacenamiento lisosomal. La α -galactosidasa A tiene una estructura dimérica que consiste en dos dominios (dominio TIM barrel y dominio similar a la inmunoglobulina que contiene láminas β) (Journal of Biological Chemistry, vol. 287, n.º 34, 2012; y Lieberman et al. Biochemistry, Vol. 48, No. 22, 2009). La α -galactosidasa A se despliega en un entorno con un pH elevado, por lo que se requiere que una formulación que contiene α -galactosidasa A mantenga un nivel apropiado de pH. En particular, el sitio activo se mantiene en el estado de agregados solubles formados a medida que se despliega un dominio, pero la actividad se pierde una vez que se forman agregados insolubles a medida que avanza el despliegue, por lo que se requiere que la formulación liofilizada incluya estabilizadores para ejercer la actividad enzimática manteniendo el estado de agregado soluble. En la presente invención, la α -galactosidasa A puede estar en forma nativa o en forma recombinante y, específicamente, puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pero no se limita a ello.

La α -galactosidasa A incluye fragmentos de una forma nativa, o análogos de la misma, sin limitación, que tienen mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, adición, deleción, modificación y una combinación de las mismas, siempre que los análogos tengan una actividad equivalente a la de la forma nativa de la enzima.

La α -galactosidasa A puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 60 %, 70 % o 80 %, específicamente al menos un 90 %, más específicamente, al menos un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de homología o identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y puede obtenerse a partir de microorganismos utilizando tecnología de recombinación o estar disponible comercialmente, pero no se limita a ello.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "homología" se refiere al grado de similitud con una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre o una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, y la comparación de homología puede realizarse mediante observación a simple vista o utilizando un programa de comparación disponible comercialmente. El programa informático disponible comercialmente puede utilizarse para calcular la homología entre dos o más secuencias en forma de porcentaje (%). La homología (%) puede calcularse entre secuencias adyacentes. Los términos "homología" e "identidad" pueden utilizarse indistintamente en muchos casos.

La información sobre las secuencias de la α -galactosidasa A o derivados de la misma y las secuencias de nucleótidos que las codifican puede obtenerse de bases de datos conocidas, tales como NCBI.

La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención puede prepararse mediante expresión en forma de α -galactosidasa A enlazada a una región Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador, dentro de un

transformante.

El enlazador es un enlazador peptídico, y la proteína de fusión de la presente invención puede presentarse en forma de α -galactosidasa A enlazada a la región Fc de inmunoglobulina a través del enlazador peptídico. Un extremo
5 del enlazador puede estar enlazado a una cadena de la región Fc de inmunoglobulina en forma de dímero, pero no se limita a ello.

El enlazador peptídico puede contener uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 1000 aminoácidos. El enlazador peptídico puede ser cualquier enlazador peptídico conocido en la técnica, por ejemplo, incluyendo el enlazador
10 [GS]_x, el enlazador [GGGS]_x y el enlazador [GGGGS]_x, y similares, en los que x puede ser un número natural de 1 o mayor (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o mayor), pero no se limita a ello. Específicamente, el enlazador peptídico de la presente invención puede estar compuesto de 10 a 50 aminoácidos, más específicamente, de 20 a 40 aminoácidos, y puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
15 NO: 2.

En un aspecto de la presente invención, los sitios de la α -galactosidasa A y la región Fc de inmunoglobulina, a los que está enlazado el enlazador peptídico, no están limitados siempre que se mantenga la actividad de la α -galactosidasa A y que la α -galactosidasa A esté enlazada a la región Fc de inmunoglobulina.
20 Específicamente, los sitios pueden estar en un extremo de cada una de las regiones α -galactosidasa A e inmunoglobulina Fc, más específicamente, en el

extremo C-terminal de la α -galactosidasa A y en el extremo N-terminal de la región inmunoglobulina Fc, pero no se limitan a ellos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "extremo N-terminal" o "extremo C-terminal" se refieren al extremo amino y al extremo
5 carboxilo de una proteína, respectivamente. Ejemplos de los mismos pueden ser el último residuo de aminoácido del extremo N-terminal o del extremo C-terminal, pero también los residuos de aminoácidos cercanos al extremo N-terminal o al extremo C-terminal, específicamente, el primer residuo de aminoácido hasta el décimo residuo de aminoácido desde el último extremo.

10 En la presente invención, los enlazadores peptídicos pueden estar enlazados a los monómeros de la región Fc de inmunoglobulina en una forma dimérica compuesta por regiones Fc de inmunoglobulina monoméricas, respectivamente, y cada uno de los enlazadores respectivamente enlazados a los monómeros de la región Fc de inmunoglobulina pueden estar enlazado
15 independientemente a una molécula de α -galactosidasa A, respectivamente, pero no se limitan a ello.

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

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "región Fc de inmunoglobulina" se refiere a una región que incluye un dominio constante de

cadena pesada 2 (CH2) y/o un dominio constante de cadena pesada 3 (CH3),
excluyendo los dominios variables de cadena pesada y cadena ligera de la
inmunoglobulina. En un aspecto de la presente invención, tal región Fc de
inmunoglobulina puede incluir una región bisagra modificada, pero no se limita a
5 ello. Específicamente, la región Fc de inmunoglobulina puede tener mutaciones
seleccionadas del grupo que consiste en sustitución, adición, delección,
modificación y cualquier combinación de las mismas en la región Fc de
inmunoglobulina nativa, pero no se limita a ello.

La región Fc de inmunoglobulina es una sustancia utilizada como vehículo
10 en la fabricación de fármacos. Para estabilizar las proteínas y evitar la
eliminación de proteínas por los riñones, recientemente se han llevado a cabo
investigaciones sobre proteínas de fusión utilizando regiones Fc de
inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas son constituyentes principales de la
sangre y hay cinco tipos diferentes: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El tipo más utilizado
15 frecuentemente para los estudios de proteínas de fusión es la IgG, que se
clasifica en cuatro subtipos, IgG1 a IgG4.

La región Fc de inmunoglobulina puede incluir una región bisagra en el
dominio constante de cadena pesada, y los monómeros de la región Fc de
inmunoglobulina pueden constituir un dímero a través de la región bisagra, pero
20 no se limita a ello. La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención
puede ser una región Fc extendida que incluye una parte o la totalidad de un

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

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia bisagra" se refiere a un sitio localizado en una cadena pesada para formar el dímero de
20 la región Fc de inmunoglobulina a través de un enlace disulfuro, y la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en una forma en la que

dos moléculas de cadenas Fc de inmunoglobulina forman un dímero debido a la presencia de la secuencia bisagra.

Específicamente, la región bisagra puede mutarse para incluir solo una cisteína (Cys) mediante la delección de una parte de la región bisagra, o para
5 incluir un residuo de prolina (Pro) sustituido por un residuo de serina (Ser) implicado en el intercambio de cadenas. Más específicamente, la región bisagra puede presentar una sustitución del residuo de serina en la segunda posición por un residuo de prolina, pero no se limita a ello. La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
10 NO: 3, pero no se limita a ello.

La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención abarca no solo una secuencia nativa obtenida a partir de la digestión con papaína de una inmunoglobulina, sino también derivados, sustituyentes y variantes de la misma, por ejemplo, secuencias diferentes de la secuencia nativa y obtenidas por
15 mutación de uno o más residuos de aminoácidos mediante delección, adición, sustitución no conservativa o conservativa, o una combinación de las mismas. Se supone que los derivados, sustituyentes y variantes poseen la capacidad de unirse a FcRn.

Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214 a 238,
20 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331 en IgG Fc, que se sabe que son importantes para el enlazamiento, pueden utilizarse como sitios adecuados para la mutación.

Además, se pueden obtener diversos tipos de derivados, por ejemplo, eliminando un sitio capaz de formar un enlace disulfuro, eliminando algunos residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal del Fc nativo o añadiendo un residuo de metionina en el extremo N-terminal del Fc nativo. Además, para
5 eliminar las funciones efectoras, se pueden eliminar los sitios de unión al complemento, por ejemplo, un sitio de unión a C1q, y se puede eliminar un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las técnicas para preparar tales derivados de secuencia de la región Fc de inmunoglobulina se divulgan los documentos en WO 97/34631 y WO 96/32478,
10 y similares.

Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos que no alteran la actividad completa de las moléculas son bien conocidos en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que ocurren con mayor frecuencia son los intercambios entre
15 residuos de aminoácidos Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly. En algunos casos, pueden ocurrir modificaciones por fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación o similares.

20 Los derivados Fc descritos anteriormente exhiben una actividad biológica equivalente a la de la región Fc de la presente invención y pueden tener una

estabilidad estructural mejorada de la región Fc frente al calor, el pH y similares.

Tal región Fc puede obtenerse a partir de formas nativas aisladas de organismos vivos humanos o animales, tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y cobayas, o puede tratarse de formas recombinantes o derivados de las mismas obtenidos a partir de células animales transformadas o microorganismos. En particular, la región Fc puede obtenerse a partir de una forma nativa aislando una inmunoglobulina completa de un cuerpo humano o animal vivo y luego tratando la inmunoglobulina aislada con proteasa. La inmunoglobulina aislada se digiere en Fab y Fc cuando se trata con papaína, y se digiere en pF'c y F(ab)₂ cuando se trata con pepsina. Estos fragmentos pueden someterse a cromatografía de exclusión por tamaño o similar para separar Fc o pF'c de los mismos. En una realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de inmunoglobulina recombinante en la que una región Fc derivada de humano se obtiene de un microorganismo.

Alternativamente, la región Fc de inmunoglobulina puede estar en forma de glicanos nativos, glicanos aumentados en comparación con la forma nativa, o glicanos disminuidos en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglucosilada. El aumento, la disminución o la eliminación de los glicanos Fc de inmunoglobulina puede lograrse mediante el uso de procedimientos convencionales, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética utilizando

un microorganismo. En particular, la región Fc de inmunoglobulina obtenida mediante la eliminación de glicanos de Fc exhibe un deterioro significativo en la afinidad de unión al complemento c1q y una reducción o pérdida de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o de la citotoxicidad dependiente del
5 complemento, por lo que no causa una respuesta inmunitaria innecesaria in vivo. En este sentido, una región Fc de inmunoglobulina desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuada como vehículo de fármacos para su propio fin.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "desglicosilación" indica una región Fc en la que los glicanos se eliminan mediante una enzima, y
10 el término aglicosilación indica una región Fc no glicosilada producida en procariotas, más específicamente en *E. coli*.

Por otra parte, la región Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede originarse de seres humanos o animales, tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y cobayas, y más específicamente, la
15 región Fc de inmunoglobulina se origina de seres humanos.

Además, la región Fc de inmunoglobulina puede ser una región Fc derivada de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, o una combinación o híbrido de las mismas. En una realización más específica, la región Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG o IgM, que es la más abundante en la sangre humana, y en una realización
20 aún más específica, la región Fc de inmunoglobulina se deriva de IgG, que se sabe que aumenta la semivida de las proteínas de unión a ligandos. En una

realización aún más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4, y en una realización aún más específica, la región Fc de inmunoglobulina es una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana, pero no se limita a ello. La región Fc de inmunoglobulina de la presente invención
5 puede incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero no se limita a ello. Más específicamente, la región Fc de inmunoglobulina puede incluir un monómero que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y la región Fc de inmunoglobulina puede ser un homodímero de monómeros, cada uno de los cuales tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero no se limita
10 a ello.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "combinación" se refiere a la formación de un enlace entre un polipéptido que codifica una región Fc de inmunoglobulina de cadena única del mismo origen y un polipéptido de cadena única de un origen diferente cuando se forma un dímero o un multímero.
15 Es decir, se puede preparar un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos de IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc e IgE Fc.

La región Fc de inmunoglobulina de la proteína de fusión α -galactosidasa A puede estar en forma dimérica, específicamente, y puede tener una estructura
20 en la que dos cadenas polipeptídicas están enlazadas entre sí mediante un enlace disulfuro. Más específicamente, las dos cadenas pueden estar enlazadas

a través de un átomo de nitrógeno de una de ellas, pero no se limitan a ello. El enlazamiento a través de un átomo de nitrógeno puede lograrse mediante la aminación reductora de un átomo ϵ -amino de lisina o del grupo amino N-terminal, pero no se limita a ello. En una realización específica, la región Fc de
5 inmunoglobulina puede lograr el enlazamiento a través de un átomo de nitrógeno de prolina en el extremo N-terminal de la misma, pero no se limita a ello. Una región Fc de la forma dimérica puede estar enlazada covalentemente a dos moléculas de α -galactosidasa A a través de dos enlazadores, pero no se limita a ello.

10 A menos que se indique lo contrario en la presente memoria, la divulgación de la α -galactosidasa A o la proteína de fusión de acuerdo con la presente invención en la descripción detallada o en las reivindicaciones puede aplicarse no solo a la α -galactosidasa A o la proteína de fusión, sino también a sales de la misma (por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables) o formas
15 solvantadas de la misma. Por lo tanto, aunque en la presente memoria solo se describe la " α -galactosidasa A" o la "proteína de fusión», la divulgación correspondiente también puede aplicarse a sales específicas de la misma, solvatos específicos de la misma y solvatos de las sales particulares. Estas sales pueden estar, por ejemplo, en la forma en que se utiliza cualquier sal
20 farmacéuticamente aceptable. El tipo de sales no está particularmente limitado. Sin embargo, las sales se presentan preferentemente en una forma que sea

segura y eficaz para un sujeto, por ejemplo, un mamífero, pero no se limitan particularmente a ello.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que puede utilizarse eficazmente para un fin deseado sin causar toxicidad excesiva, irritación, reacciones alérgicas y similares, dentro del ámbito de la decisión médica y farmacéutica.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal derivada de ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos o bases farmacéuticamente aceptables. Algunos ejemplos de sales adecuadas pueden incluir ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido tolueno-p-sulfónico, ácido tartárico, ácido acético, ácido cítrico, ácido metanosulfónico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido malónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido bencenosulfónico y similares. Las sales derivadas de bases adecuadas pueden incluir metales alcalinos tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos tales como magnesio, amonio y similares.

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

La proteína de fusión puede prepararse o fabricarse mediante cualquier

procedimiento conocido en la técnica y, específicamente, la proteína de fusión puede obtenerse mediante el cultivo de células animales, en las que se inserta un vector de expresión, y la purificación del cultivo, o puede sintetizarse sobre la base de la secuencia de la misma, pero no se limita a ello.

5 La formulación liofilizada de la presente invención puede utilizarse para evitar, tratar y aliviar una enfermedad, tal como la deficiencia de α -galactosidasa A, que puede evitarse, tratarse o aliviarse mediante la administración de la proteína de fusión α -galactosidasa A, pero no se limita a ello.

 La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención puede
10 utilizarse como fármaco para la Terapia de Reemplazo Enzimático (ERT). La Terapia de Reemplazo Enzimático permite evitar o tratar una enfermedad mediante la recuperación de la hipofunción enzimática, complementando las enzimas deficientes o insuficientes que causan la enfermedad.

 Específicamente, la formulación liofilizada de la presente invención puede
15 utilizarse para evitar, tratar o aliviar la deficiencia de α -galactosidasa A. La deficiencia de α -galactosidasa A es una enfermedad de almacenamiento lisosomal causada por la deficiencia de α -galactosidasa A (α -Gal A), una enzima lisosomal, y ejemplos de la misma incluyen la enfermedad de Fabry, el angiokeratoma difuso, el angiokeratoma corporis diffusum y la lipidosis distrófica
20 hereditaria.

 La enfermedad de Fabry, una de las enfermedades de almacenamiento

lisosomal, es un trastorno hereditario recesivo causado por la inactivación del cromosoma X. La enfermedad de Fabry es un trastorno metabólico congénito de los glicosfingolípidos causado por una actividad deficiente o insuficiente de la α -galactosidasa A. Se sabe que la globotriaosilceramida (Gb3) se acumula de
5 forma anómala en la pared de los vasos sanguíneos y en diversas partes del cuerpo, tales como la piel, los riñones, el corazón y el sistema nervioso, debido a la anomalía de la α -galactosidasa A, lo que afecta significativamente a la reducción de la circulación sanguínea y al suministro de nutrientes. Se producen síntomas, tal como hipersensibilidad al frío, dolor intenso, acroparestesia,
10 angiokeratoma, opacidad corneal, isquemia cardíaca, infarto de miocardio, e insuficiencia renal, y finalmente los riñones no funcionan correctamente, dando como resultado la muerte.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "prevención" se refiere a cualquier acción que inhiba o retrase la aparición de una enfermedad
15 mediante la administración de la proteína de fusión o una formulación liofilizada que contenga la proteína de fusión, y el término "tratamiento" se refiere a cualquier acción que alivie, mejore o modifique de forma beneficiosa los síntomas de una enfermedad objetivo mediante la administración de la proteína de fusión o una formulación liofilizada que contenga la proteína de fusión.

20 En una realización específica de la presente invención, la formulación liofilizada de la presente invención puede utilizarse para evitar o tratar la

enfermedad de Fabry, pero no se limita a ello.

Además, la formulación liofilizada de la presente invención puede administrarse por vía subcutánea, pero no se limita a ello. Específicamente, la formulación liofilizada de la presente invención en estado liofilizado puede reconstituirse para que sea adecuada para la administración subcutánea.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "administración" se refiere a la introducción de la formulación liofilizada reconstituida en un paciente mediante cualquier procedimiento adecuado. La vía de administración de la formulación liofilizada no está especialmente limitada, pero la formulación liofilizada puede administrarse por cualquier vía general siempre que la proteína de fusión α -galactosidasa A de la formulación liofilizada pueda lograr un objetivo en el organismo vivo, por ejemplo, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración intradérmica, administración oral, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar o administración rectal, pero no se limita a ellas.

La dosificación preferente de la proteína de fusión de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,0001 mg a 500 mg por cada kg de peso corporal del paciente al día, y la formulación liofilizada de la presente invención puede formularse para una administración de dosificación apropiada o reconstituirse para una administración de dosificación apropiada. Sin embargo,

con respecto a la dosificación de la proteína de fusión, la dosis efectiva de la misma se determina considerando diversos factores, tales como la edad, el peso corporal, el estado de salud y el sexo del paciente, la gravedad de la enfermedad, la dieta y la tasa de excreción, además de la vía de administración y la frecuencia
5 del tratamiento, por lo que, considerando estos factores, una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente una dosis eficaz que sea apropiada para el uso particular de la formulación liofilizada de la presente invención.

De acuerdo con todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para preparar la formulación liofilizada.

10 Específicamente, el procedimiento de preparación puede incluir la liofilización de una solución acuosa que contenga una proteína de fusión α -galactosidasa A, un tampón y un azúcar o alcohol de azúcar.

La solución acuosa o la formulación liofilizada pueden contener además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido,
15 un tensioactivo no iónico y un conservante.

La solución acuosa, la formulación liofilizada y componentes constitutivos de la misma son los descritos anteriormente.

El procedimiento puede incluir la liofilización de 1 a 10 mL, específicamente de 5 a 10 mL, de una solución acuosa que contiene: una
20 proteína de fusión α -galactosidasa A en la que la α -galactosidasa A está enlazada a una región Fc de inmunoglobulina; un tampón; y un azúcar o alcohol

de azúcar, pero no se limita a ello.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para reconstituir la formulación liofilizada, el procedimiento incluye añadir una solución de reconstitución a la formulación liofilizada.

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

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "solución de reconstitución" se refiere a una solución que se añade a una formulación liofilizada en estado sólido para lograr la reconstitución. Los ejemplos de la solución de reconstitución pueden incluir agua destilada (agua), pero no se limitan particularmente a ella.

La formulación reconstituida puede contener una proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración adecuada para su administración a un sujeto y, específicamente, puede contener una proteína de fusión α -galactosidasa A en una concentración de 10 a 100 mg/mL, de 10 a 90 mg/mL, de 10 a 50 mg/mL o de 10 a 30 mg/mL, pero no se limita a ello.

La formulación reconstituida puede obtenerse reconstituyendo la formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención para que sea adecuada para la administración subcutánea a un sujeto, pero no se limita a ello.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se

proporciona una formulación liofilizada para evitar o tratar una enfermedad.

La formulación liofilizada es la descrita anteriormente.

Un ejemplo de la enfermedad puede ser la enfermedad de Fabry, pero cualquier enfermedad para la que la formulación liofilizada o la proteína de fusión
5 α -galactosidasa A incluida en la presente invención pueda exhibir un efecto preventivo o terapéutico puede incluirse sin limitación.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona el uso de la formulación liofilizada para evitar o tratar una enfermedad.

10 La formulación liofilizada y la enfermedad son las descritas anteriormente.

De aquí en adelante en la presente memoria, se describirá detalladamente la presente invención con referencia a ejemplos y ejemplos experimentales. Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales solo sirven para ilustrar la presente invención, y el ámbito de la presente invención no se limita a
15 ello.

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

Una proteína de fusión de α -galactosidasa A y una región Fc de inmunoglobulina (de aquí en adelante en la presente memoria, denominada
20 como proteína de fusión α -galactosidasa A, SEQ ID NO: 4), en el que la α -galactosidasa A nativa (SEQ ID NO: 1) y una región Fc de inmunoglobulina (SEQ

ID NO: 3) se enlazaron mediante un enlazador (SEQ ID NO: 2), se preparó.

Específicamente, un polinucleótido (SEQ ID NO: 5) La codificación de la proteína de fusión α -galactosidasa A se insertó en un vector XOGC como vector de expresión, utilizando una enzima de restricción para construir un vector que
5 expresara la proteína de fusión α -galactosidasa A.

Las secuencias de ADN y proteínas de la proteína de fusión α -galactosidasa A se muestran en la Tabla 1 a continuación. En la secuencia de proteínas de la Tabla 1 a continuación, los textos subrayados indican una secuencia de señal, las letras en negrita indican sustituciones de aminoácidos y
10 las letras en cursiva indican el enlazador. La proteína de fusión α -galactosidasa A de la presente invención es un dímero formado por dos monómeros cada uno que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

Tabla 1

	Secuencia			SEQ ID NO
Proteína	MQLRNPELHL	GCALALRFLA	LVSWDIPGAR	4
	ALDNGLARTP	TMGWLHWERF	MCNLDCQEEP	
	DSCISEKLFM	EMAELMVSEG	WKDAGYEYLC	
	IDDCWMAPQR	DSEGRQLQADP	QRFPHGIRQL	
	ANYVHSKGLK	LGIYADVGNK	TCAGFPGSFG	
	YYDIDAQTFA	DWGVDLLKFD	GCYCDSLENL	
	ADGYKHMSLA	LNRTGRSIVY	SCEWPLYMWP	
	FQKPNYTEIR	QYCNHWRNFA	DIDDSWKSII	
	SILDWTSFNQ	ERIVDVAGPG	GWNDPDMLEI	
	GNFGLSWNQQ	VTQMALWAIM	AAPLFMSNDL	
	RHISPAKAL	LQDKDVIIN	QDPLGKQGYQ	
	LRQGDNFEVW	ERPLSGLAWA	VAMINRQEIG	
	GPRSYTIAVA	SLGKGVACNP	ACFITQLLPV	
	KRKLGFYEWT	SRLRSHINPT	GTVLLQLENT	
	MQMSLKDLLG	GGGSGGGGSG	GGGSGGGGSG	
	GGGSGGGGSP	PCPAPEFLGG	PSVFLFPPKP	

(continuación)

	Secuencia	SEQ ID NO
	KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFQ STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK	
ADN	ATGCAGCTGA GGAACCCAGA ACTACATCTG GGCTGCGCGC TTGCGCTTCG CTCCTGGCC CTCGTTTCCT GGGACATCCC TGGGGCTAGA GCACTGGACA ATGGATTGGC AAGGACGCCT ACCATGGGCT GGCTGCACTG GGAGCGCTTC ATGTGCAACC TTGACTGCCA GGAAGAGCCA GATTCTGCA TCAGTGAGAA GCTCTTCATG GAGATGGCAG AGCTCATGGT CTCAGAAGGC TGAAGGATG CAGGTTATGA GTACCTCTGC ATTGATGACT GTTGGATGGC TCCCCAAAGA GATTCAGAAG GCAGACTTCA GGCAGACCCT CAGCGCTTTC CTCATGGGAT TCGCCAGCTA GCTAATTATG TTCACAGCAA AGGACTGAAG CTAGGGATTT ATGCAGATGT TGGAAATAAA ACCTGCGCAG GCTTCCCTGG GAGTTTTGGA TACTACGACA TTGATGCCCA GACCTTTGCT GACTGGGGAG TAGATCTGCT AAAATTTGAT GGTTGTTACT GTGACAGTTT GGAAAATTTG GCAGATGGTT ATAAGCACAT GTCCTTGGCC CTGAATAGGA CTGGCAGAAG CATTGTGTAC TCCTGTGAGT GGCCTCTTTA TATGTGGCCC TTTCAAAGC CCAATTATAC AGAAATCCGA CAGTACTGCA ATCACTGGCG AAATTTTGCT GACATTGATG ATTCCTGGAA AAGTATAAAG AGTATCTTGG ACTGGACATC TTTTAACCAG GAGAGAATTG TTGATGTTGC TGGACCAGGG GGTTGGAATG ACCCAGATAT GTTAGTGATT GGCAACTTTG GCCTCAGCTG GAATCAGCAA GTAACCTAGA TGGCCCTCTG GGCTATCATG GCTGCTCCTT TATTCATGTC TAATGACCTC CGACACATCA GCCCTCAAGC CAAAGCTCTC CTTCAGGATA AGGACGTAAT TGCCATCAAT CAGGACCCCT TGGGCAAGCA AGGGTACCAG	5

(continuación)

	Secuencia	SEQ ID NO
	CTTAGACAGG GAGACAACTT TGAAGTGTGG GAACGACCTC TCTCAGGCTT AGCCTGGGCT GTAGCTATGA TAAACCGGCA GGAGATTGGT GGACCTCGCT CTTATACCAT CGCAGTTGCT TCCCTGGGTA AAGGAGTGGC CTGTAATCCT GCCTGCTTCA TCACACAGCT CCTCCCTGTG AAAAGGAAGC TAGGGTTCTA TGAATGGACT TCAAGGTAA GAAGTCACAT AAATCCCACA GGCACTGTT TGCTTCAGCT AGAAAATACA ATGCAGATGT CATTAAAAGA CTTACTTGGC GGC GGAGGTT CAGGTGGTGG TGGCTCTGGC GGTGGAGGGT CGGGGGGAGG CGGCTCTGGA GGAGGGGGCT CCGGTGGGGG AGGTAGCCCA CCAT GCCCAG CACCTGAGTTCCTGGGGGGA CCATCAGTCT TCCTGTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CAGGAAGACC CTGAGGTCCA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTTCC AA AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGGC CTCCCATCCT CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCAGGAGGAG ATGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAGGCTAA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGGAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCTGGGTAAA TGA	

El vector construido (pX0GC-alfa-galactosidasa-Fc) que expresa la proteína de fusión α -galactosidasa A se transfectó en una línea celular CHO-S para preparar una línea celular capaz de producir en masa la proteína de fusión

α -galactosidasa A.

Específicamente, las células CHO-S se cultivaron en suspensión en un matraz Erlenmeyer de 1-L (Corning, cat. No. 431147) utilizando un medio libre de suero (FreeStyle CHO Expression Medium, Thermo Fisher, cat. No. 12651014). Cuando las células del recipiente de cultivo alcanzaron los 5×10^8 , las células se transformaron utilizando FreeStyle Max (Thermo Fisher, cat. No. 16447-100). Es decir, 10 mL de OptiPro SFM (Thermo Fisher, cat. No. 12309-019) se colocó en cada uno de los dos tubos. A un tubo se añadieron 500 μ g de ADN y al otro tubo se añadieron 500 μ L de FreeStyle Max. Luego, se mezclaron las dos soluciones y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A partir de entonces, la mezcla se añadió a las células, para las que el medio había sido previamente intercambiado con medio de expresión FreeStyle CHO fresco (Thermo Fisher, cat. No. 12651014). Las células se cultivaron durante aproximadamente 96 horas bajo condiciones de 37 °C, 5 %CO₂ y 125 rpm para preparar la proteína de fusión α -galactosidasa A.

En la proteína de fusión α -galactosidasa A así preparada, cada uno de los dos monómeros de la región Fc de inmunoglobulina que constituyen el dímero está enlazado a una α -galactosidasa A, formando así una estructura en la que la región Fc de inmunoglobulina en forma dimérica está fusionada a dos moléculas de α -galactosidasa A.

Ejemplo 2: Mejora en la apariencia de la formulación liofilizada de acuerdo

con los cambios de pH.

Ejemplo 2-1: Preparación de formulaciones liofilizadas.

Se prepararon varias formulaciones liofilizadas con diversas combinaciones de pH y contenidos del tensioactivo no iónico y el aminoácido.

- 5 Las formulaciones liofilizadas se evaluaron en cuanto a su apariencia, apariencia después de la disolución y análisis SE-HPLC.

Para la preparación de las formulaciones liofilizadas, cada solución para formulaciones que tienen las composiciones que se muestran en la Tabla 2 a continuación se alicuotó en un vial de vidrio (20 mL) con 4,0 mL, se semi tapó con un tapón de goma y luego, se cargó en un estante de un liofilizador (Lyostar 3, SP Scientific). Posteriormente, se llevó a cabo la liofilización bajo las condiciones que se indican en la Tabla 3 a continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completarse la liofilización del aluminio.

15 Tabla 2

#	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Tampón (L-Histidina (mM))	Aminoácido (L-Serina (%,(P/V)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(P/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

(continuación)

#	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Tampón (L-Histidina (mM))	Aminoácido (L-Serina (%,(P/V)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(P/V)))	pH
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

Tabla 3

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	5	-55	-25	25
Tasa de cambio de temperatura (°C/min)	0	0,33	0,33	0,25
Tiempo de mantenimiento (min)	30	300	4500	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	60	50

5 Ejemplo 2-2: Disolución y apariencia de las formulaciones liofilizadas

Cada vial liofilizado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para eliminar la humedad generada en la superficie del vial y luego se

examinó la apariencia de la torta.

Se colocó una aguja de 25G (1 pulgada o más) en una jeringa de 2 mL, se extrajeron 2 mL de agua destilada y luego, se inyectaron en cada vial que contenía el producto liofilizado en un ángulo de 90 grados. Dado que se mantuvo
5 el vacío dentro del vial, el agua destilada se inyectó automáticamente.

Una vez completada la inyección de agua destilada, se separaron la aguja y la jeringa para liberar el vacío restante dentro del vial, y luego se retiró la aguja. El vial se agitó 5 veces y se dejó en reposo hasta que la torta liofilizada se disolvió.

Se examinó la apariencia de la solución disuelta en el vial y luego se dejó
10 reposar el vial bajo refrigeración durante 3 días, seguido de un examen posterior de la apariencia.

Ejemplo 2-3: Cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

El producto liofilizado disuelto en el Ejemplo 2-2 se diluyó utilizando una fase móvil (1xPBS, Lonza) hasta una concentración de 1 mg/mL y luego se filtró
15 utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm. A partir de entonces, se inyectaron 200 µL de la muestra filtrada en un inserto de vial y luego se preparó en un vial con tapón de rosca.

Posteriormente, la fase móvil se conectó a una bomba y luego se montó una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los instrumentos
20 Waters e2695 y Waters 2489 (Waters), mientras que la fase móvil fluía a un caudal de 0,5 mL/min. La muestra se equilibró haciendo fluir la fase móvil a un

caudal de 0,5 mL/min durante 30 minutos o más, hasta que las señales del detector se estabilizaron. Cuando la temperatura del automuestreador se redujo a 4 °C, la muestra se colocó en el muestreador, y se inyectaron 10 µL de la muestra. A partir de entonces, se dejó fluir la fase móvil durante 35 minutos y se
5 identificaron los picos de detección a 214 nm. El análisis se realizó con el software Empower Pro en un PC.

Ejemplo 2-4: Comparación de apariencias y tasas de recuperación de la forma nativa de las formulaciones liofilizadas de acuerdo con los cambios de pH.

En primer lugar, como resultado de comparar la apariencia de la torta
10 entre las formulaciones liofilizadas preparadas en el Ejemplo 2-2, se observó que la apariencia fue apropiada sin colapso grave bajo ninguna las condiciones (FIG. 1).

La apariencia inmediatamente después de la disolución era transparente bajo todas las condiciones, pero la apariencia después de 3 días de reposo bajo
15 refrigeración se volvió más turbia a medida que disminuía el pH (FIG. 1). Específicamente, las formulaciones liofilizadas con un pH de 6,5 o superior mostraron una apariencia transparente después de su disolución.

Como resultado de examinar la tasa de recuperación de la forma nativa en las formulaciones liofilizadas preparadas mediante cromatografía de
20 exclusión por tamaño, la tasa de recuperación de la forma nativa disminuyó a medida que se reducía el pH (FIG. 2). Específicamente, las formulaciones

lío­filizadas con un pH de 6,5 o superior mostraron una alta tasa de recuperación de la forma nativa. La forma nativa indica la proteína de fusión α -galactosidasa A preparada en el Ejemplo 1-1.

Los resultados de la comparación de apariencias y tasas de recuperación de la forma nativa de las formulaciones liofilizadas de acuerdo con los cambios de pH se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

#	Apariencia de la torta del producto liofilizado	Apariencia inmediatamente después de la disolución	Apariencia después de la disolución seguida por almacenamiento durante tres días	Tasa de recuperación de la forma nativa (%)
1	Elegante	Transparente	Muy turbia	96,5
2	Elegante	Transparente	Transparente	97,8
3	Elegante	Transparente	Turbia	95,3
4	Elegante	Transparente	Transparente	98,0
5-7	Elegante	Transparente	Transparente	96,1
8	Elegante	Transparente	Muy turbia	92,4
9	Elegante	Transparente	Transparente	95,7
10	Elegante	Transparente	Ligeramente turbia	87,8
11	Elegante	Transparente	Transparente	90,5

Ejemplo 3: Condiciones para mejorar la tasa de recuperación de la forma nativa mediante el pH, el cambio en el volumen de llenado y el cribado de azúcares.

Ejemplo 3-1: Preparación de formulaciones liofilizadas.

Después de que se confirmó que la apariencia después de la disolución se mejoró para las formulaciones con un pH de 6,5 o superior en el Ejemplo 2 anterior, con el fin de aumentar la tasa de recuperación de la forma nativa, se prepararon diversas formulaciones liofilizadas añadiendo un tampón, un aminoácido, un tensioactivo no iónico, variando el volumen de llenado y tres tipos de azúcares (sacarosa, trehalosa, manitol) a la solución cruda final y luego se realizó un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño.

Cada solución para las formulaciones que tienen las composiciones que se muestran en la Tabla 5 a continuación se alicuotó en un vial de vidrio (20 mL) con 4 mL o 6 mL, se semi tapó con un tapón de goma y luego se cargó en un estante de un liofilizador (Lyostar 3, SP Scientific). Posteriormente, se llevó a cabo la liofilización bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 6 a continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completarse la liofilización del aluminio.

15 Tabla 5

#	pH	Tampón (L-Histidina (mM))	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Azúcar	Cantidad de carga (mL)	Aminoácido (L-Serina (%,(p/v)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(p/v)))
1		6,67		Sacarosa 10 mg/mL		1,4	0,017

(continuación)

#	pH	Tampón (L-Histidina (mM))	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Azúcar	Cantidad de carga (mL)	Aminoácido (L-Serina (%,(p/v)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(p/v)))
2	6,5	6,67	20	Trehalosa 10 mg/mL	6		
3		6,67		Manitol 10 mg/mL			
4		6,67		-			
5	6,8	6,67	20	Sacarosa 10 mg/mL	6	1,4	0,017
6		6,67		Trehalosa 10 mg/mL			
7		6,67		Manitol 10 mg/mL			
8				-			
10	6,5	10	30	Sacarosa 15 mg/mL	4	2,1	0,025
12		10		Trehalosa 15 mg/mL			
14		10		Manitol 15 mg/mL			
16		10		-			
18	6,8	10	30	Sacarosa 15 mg/mL	4	2,1	0,025
20		10		Trehalosa 15 mg/mL			
22		10		Manitol 15 mg/mL			
24		10		-			

Tabla 6

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	5	-55	-25	25

(continuación)

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Tasa de cambio de temperatura (°C/min)	0	0,33	0,33	0,25
Tiempo de mantenimiento (min)	30	300	4500	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	60	50

Ejemplo 3-2: Disolución y apariencia de las formulaciones liofilizadas

Cada vial liofilizado preparado en el Ejemplo 3-1 se dejó reposar a
 5 temperatura ambiente durante 30 minutos para eliminar la humedad generada
 en la superficie del vial y luego se examinó la apariencia de la torta.

Se colocó una aguja de 25G (1 pulgada o más) en una jeringa de 2 mL,
 se extrajeron 2 mL de agua destilada y luego, se inyectaron en cada vial que
 contenía el producto liofilizado en un ángulo de 90 grados. Dado que se mantuvo
 10 el vacío dentro del vial, el agua destilada se inyectó automáticamente.

Una vez completada la inyección de agua destilada, se separaron la aguja
 y la jeringa para liberar el vacío restante dentro del vial, y luego se retiró la aguja.
 El vial se agitó 5 veces y se dejó en reposo hasta que la torta liofilizada se disolvió.

Ejemplo 3-3: Cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

15 El producto liofilizado disuelto en el Ejemplo 3-2 se diluyó utilizando una
 fase móvil (1xPBS, Lonza) hasta una concentración de 1 mg/mL y luego se filtró

utilizando un filtro de jeringa de 0,2 μm . A partir de entonces, se inyectaron 200 μL de la muestra filtrada en un inserto de vial y luego se preparó en un vial con tapón de rosca.

Posteriormente, la fase móvil se conectó a una bomba y luego se montó
5 una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los instrumentos Waters e2695 y Waters 2489 (Waters), mientras que la fase móvil fluía a un caudal de 0,5 mL/min. La muestra se equilibró haciendo fluir la fase móvil a un caudal de 0,5 mL/min durante 30 minutos o más, hasta que las señales del detector se estabilizaron. Cuando la temperatura del automuestreador se redujo
10 a 4 °C, la muestra se colocó en el muestreador, y se inyectaron 10 μL de la muestra. A partir de entonces, se dejó fluir la fase móvil durante 35 minutos y se identificaron los picos de detección a 214 nm. El análisis se realizó con el software Empower Pro en un PC.

Ejemplo 3-4: Condiciones para mejorar la tasa de recuperación de la
15 forma nativa de acuerdo con el pH, los cambios en el volumen de llenado y el
tipo de azúcar.

En primer lugar, como resultado de la comparación de la apariencia del pastel entre las formulaciones liofilizadas preparadas en el Ejemplo 3-2, no se observó ningún colapso grave bajo ninguna de las condiciones (FIGS. 3 y 4).

20 Como resultado de examinar la tasa de recuperación de la forma nativa en las formulaciones liofilizadas preparadas mediante cromatografía de

exclusión por tamaño, la proporción de la forma nativa con respecto a la solución cruda final apenas disminuyó, independientemente del pH bajo las condiciones que contenían tres tipos de azúcares, pero la proporción de la forma nativa con respecto a la solución cruda final disminuyó bajo todas las condiciones que no
5 contenían azúcares (FIGS. 5 y 6).

Estos resultados sugieren que las formulaciones liofilizadas que contienen la proteína de fusión de la presente invención, que contienen azúcares, mostraron una excelente tasa de recuperación de la forma nativa, independientemente del tipo específico de azúcares.

10 Además, en cuanto a la comparación del volumen de llenado de la materia prima final, la tasa de recuperación de la forma nativa fue mayor para un volumen de llenado de 6 mL (FIGS. 5 y 6).

Ejemplo 4: Concentración óptima de sacarosa (azúcar blanco) para mejorar la tasa de recuperación de la forma nativa.

15 Ejemplo 4-1: Preparación de formulaciones liofilizadas.

Después de confirmar que la inclusión de azúcar a un pH de 6,8 mostraba una excelente tasa de recuperación de la forma nativa, se prepararon varias formulaciones liofilizadas ajustando la cantidad de sacarosa (azúcar blanco) como ejemplo representativo de los sacáridos y luego se realizó un análisis de
20 cromatografía de exclusión por tamaño.

Cada solución para las formulaciones que tienen las composiciones que se muestran en la Tabla 7 a continuación se alicuotó en un vial de vidrio (20 mL) con 6 mL, se semi tapó con un tapón de goma y luego se colocó en un estante de un liofilizador (Lyostar 3, SP Scientific). Posteriormente, se llevó a cabo la liofilización bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 7 a continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completarse la liofilización del aluminio.

Tabla 7

#	pH	Tampón (L-Histidina (mM))	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Azúcar blanco (mg/mL)	Cantidad de carga total (mL)	Aminoácido (L-Serina (%,(p/v)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(p/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			

10

Tabla 8

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	5	-55	-25	25

(continuación)

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Tasa de cambio de temperatura (°C/min)	0	0,33	0,33	0,25
Tiempo de mantenimiento (min)	30	300	2500	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	60	50

Ejemplo 4-2: Disolución y apariencia de las formulaciones liofilizadas

Cada vial liofilizado se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para eliminar la humedad generada en la superficie del vial y luego se
 5 examinó la apariencia de la torta.

Se colocó una aguja de 25G (1 pulgada o más) en una jeringa de 2 mL, se extrajeron 2 mL de agua destilada y luego, se inyectaron en cada vial que contenía el producto liofilizado en un ángulo de 90 grados. Dado que se mantuvo el vacío dentro del vial, el agua destilada se inyectó automáticamente.

10 Una vez completada la inyección de agua destilada, se separaron la aguja y la jeringa para liberar el vacío restante dentro del vial, y luego se retiró la aguja. El vial se agitó 5 veces y se dejó en reposo hasta que la torta liofilizada se disolvió.

Ejemplo 4-3: Cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

El producto liofilizado disuelto en el Ejemplo 4-2 se diluyó utilizando una
 15 fase móvil (1xPBS, Lonza) hasta una concentración de 1 mg/mL y luego se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm. A partir de entonces, se inyectaron 200

μL de la muestra filtrada en un inserto de vial y luego se preparó en un vial con tapón de rosca.

Posteriormente, la fase móvil se conectó a una bomba y luego se montó una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los instrumentos
5 Waters e2695 y Waters 2489 (Waters), mientras que la fase móvil fluía a un caudal de 0,5 mL/min. La muestra se equilibró haciendo fluir la fase móvil a un caudal de 0,5 mL/min durante 30 minutos o más, hasta que las señales del detector se estabilizaron. Cuando la temperatura del automuestreador se redujo a 4 °C, la muestra se colocó en el muestreador, y se inyectaron 10 μL de la
10 muestra. A partir de entonces, se dejó fluir la fase móvil durante 35 minutos y se identificaron los picos de detección a 214 nm. El análisis se realizó con el software Empower Pro en un PC.

Ejemplo 4-4: Concentración óptima de azúcar blanco para mejorar la tasa de recuperación de la forma nativa.

15 En primer lugar, como resultado de comparar la apariencia de la torta entre las formulaciones liofilizadas preparadas en el Ejemplo 4-2, no se observó ningún colapso grave bajo ninguna de las condiciones (FIG. 7).

Como resultado de examinar la tasa de recuperación de la forma nativa en las formulaciones liofilizadas preparadas mediante cromatografía de
20 exclusión por tamaño, la proporción de la forma nativa con respecto a la solución cruda final se redujo menos bajo la condición que contiene azúcar blanco a una

concentración de 2,5 mg/mL (#2) (FIG. 8).

Ejemplo 5: Estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la formulación liofilizada óptima.

Ejemplo 5-1: Preparación de la formulación liofilizada

5 Considerando las condiciones óptimas de recuperación de la forma nativa derivadas de los ejemplos anteriores, se preparó una formulación liofilizada óptima, que luego se sometió a análisis de cromatografía de exclusión por tamaño a intervalos regulares mientras se almacenaba bajo condiciones de refrigeración (5 ± 3 °C).

10 Específicamente, una solución para una formulación que tiene la composición que se muestra en la Tabla 9 a continuación se alicuotó en un vial de vidrio (20 mL) con 6 mL, se semi tapó con un tapón de goma y luego se colocó en un estante de un liofilizador (Lyostar 3, SP Scientific). Posteriormente, se llevó a cabo la liofilización bajo las condiciones mostradas en la tabla 10 a
15 continuación, y la formulación liofilizada preparada se tapó con una tapa de aluminio después de completarse la liofilización del aluminio.

#	pH	Tampón (L-Histidina (mM))	Proteína de fusión (Fc-GLA (mg/mL))	Azúcar blanco (mg/mL)	Aminoácido (L-Serina (%,(p/v)))	Tensioactivo no iónico (Polisorbato 20 (%,(p/v)))
1	6,8	6,67	22	2,5	1,4	0,017

Tabla 10

	Carga	Congelación	Secado primario	Secado secundario
Temperatura (°C)	5	-55	-25	25
Tasa de cambio de temperatura (°C/min)	0	0,33	0,33	0,25
Tiempo de mantenimiento (min)	30	300	2500	1200
Presión (mTorr)	N/A	N/A	60	50

Ejemplo 5-2: Disolución y apariencia de las formulaciones liofilizadas

5 Se dejó reposar el vial liofilizado a temperatura ambiente durante 30 minutos para eliminar la humedad generada en la superficie del vial y luego se examinó la apariencia de la torta.

Se colocó una aguja de 25G (1 pulgada o más) en una jeringa de 2 mL, se extrajeron 2 mL de agua destilada y luego, se inyectaron en cada vial que
10 contenía el producto liofilizado en un ángulo de 90 grados. Dado que se mantuvo el vacío dentro del vial, el agua destilada se inyectó automáticamente.

Una vez completada la inyección de agua destilada, se separaron la aguja

y la jeringa para liberar el vacío restante dentro del vial, y luego se retiró la aguja. El vial se agitó 5 veces y se dejó en reposo hasta que la torta liofilizada se disolvió.

Ejemplo 5-3: Contenido de humedad

Se colocaron tres viales liofilizados para cada condición en una sala de
5 análisis del contenido de humedad controlada para mantener una humedad del 40 % o menos durante al menos una hora. Se prepararon tres conjuntos de 885 viales y tapas Thermoprep KF para utilizarlos como grupo de control (Blanco).

La torta liofilizada de cada uno de los viales se trituró lo más finamente posible utilizando una espátula, se transfirió a un vial Thermoprep 885 KF
10 calibrado a cero, se pesó y se tapó. Los viales de control se taparon sin pesarlos por separado. A partir de entonces, los viales preparados se colocaron en el automuestreador en el orden del grupo de control seguido del grupo de muestras.

El Controlador Remoto del Coulómetro 831 KF se programó para medir cada vial de control tres veces y cada muestra de ensayo tres veces. El número
15 total de muestras a analizar se introdujo en el Horno Compacto 885 y luego se realizó el análisis.

Ejemplo 5-4: Cromatografía líquida de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

El producto liofilizado disuelto en el Ejemplo 5-2 se diluyó utilizando una fase móvil (1xPBS, Lonza) hasta una concentración de 1 mg/mL y luego se filtró
20 utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm. A partir de entonces, se inyectaron 200 µL de la muestra filtrada en un inserto de vial y luego se preparó en un vial con

tapón de rosca.

Posteriormente, la fase móvil se conectó a una bomba y luego se montó una columna de ensayo (TSKgel G3000SWXL, Tosoh) en los instrumentos Waters e2695 y Waters 2489 (Waters), mientras que la fase móvil fluía a un caudal de 0,5 mL/min. La muestra se equilibró haciendo fluir la fase móvil a un caudal de 0,5 mL/min durante 30 minutos o más, hasta que las señales del detector se estabilizaron. Cuando la temperatura del automuestreador se redujo a 4 °C, la muestra se colocó en el muestreador, y se inyectaron 10 µL de la muestra. A partir de entonces, se dejó fluir la fase móvil durante 35 minutos y se identificaron los picos de detección a 214 nm. El análisis se realizó con el software Empower Pro en un PC.

Ejemplo 5-5: Estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la formulación liofilizada óptima.

Como resultado del análisis de apariencia y contenido de humedad de la formulación liofilizada preparada en el Ejemplo 5-1, la apariencia de la torta o la apariencia después de la disolución se mantuvieron transparentes incluso después de 12 meses bajo condiciones de refrigeración (5 ± 3 °C), y el contenido de humedad también se mantuvo en 1,0 % incluso después de 6 meses (FIG. 9).

La formulación liofilizada preparada se almacenó bajo refrigeración (5 ± 3 °C) y después de 3, 6 y 12 meses, se examinó la tasa de recuperación de la

forma nativa mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Como resultado, la proporción de la forma nativa se mantuvo con una reducción mínima incluso después de 12 meses en comparación con 0 meses (FIG. 10).

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a las
5 realizaciones ilustrativas particulares, una persona experta en la técnica a la que pertenece la presente invención puede comprender que la presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu técnico o las características esenciales de la misma. Por lo tanto, las realizaciones ejemplares descritas anteriormente deben interpretarse como ejemplificadas y
10 no limitativas de la presente divulgación. El ámbito de la invención debe interpretarse de tal manera que el significado y el ámbito de las reivindicaciones adjuntas, más que la descripción detallada y todos los cambios o variaciones derivados de los conceptos equivalentes, entran dentro del ámbito de la presente invención.