



(12) PATENT

(19) NO

(11) 329689

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20014415	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.03.09 PCT/US20/006118
(22)	Inng.dag	2001.09.11	(85)	Videreføringsdag	2001.09.11
(24)	Løpedag	2000.03.09	(30)	Prioritet	1999.03.11, US, 266014
(41)	Alm.tilgj	2001.11.12			
(45)	Meddelt	2010.11.29			
(73)	Innehaver	Shire Human Genetic Therapies, Inc, 195 Albany Street, US-MA02139 CAMBRIDGE, USA			
(72)	Oppfinner	Douglas A. Treco, 87 Brantwood Road, US-MA02476 ARLINGTON, USA Richard F. Selden, 106 Bristol Road, US-MA02481 WELLESLEY, USA Carol M. Kinoshita, 400 Davis Road, US-MA01730 BEDFORD, USA Melanie D. Williams, 7 Malden Street, US-MA01760 NATICK, USA Thomas J Schuetz, 62 Lexington Street, US-MA01702 FRAMINGHAM, USA Peter Francis Daniel, 100 North Avenue, US-MA01760 NATICK, USA Marianne Borowski, 47 Bartlett Parkway, US-MA02152 WINTHROP, USA			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua , 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Medisinske preparater til behandling av α-galaktosidase-A-defisiens			
(56)	Anførte publikasjoner	WO A2 9811206, EP A2 1020528, US A 5283317, US A 5733761, DESNICK et al; Enzyme therapy in Fabry disease: Differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic α -galactosidase A isozymes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 76, nr 10, 1979, s 5326-5330, ISSN: 0027-8424.			
(57)	Sammendrag				

Det tilveiebringes høyt rent α -Gal A og forskjellige metoder for rensing derav; α -Gal A-preparater med endret ladning og fremgangsmåter for fremstilling av preparatene; α -Gal A-preparater som har en forlenget sirkulasjonshalveringstid i en pattedyrvert og fremgangsmåter for fremstilling derav; og metoder og doseringer for administrasjon av et α -Gal A-preparat til et individ.

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et medikament for behandling av α -galaktosidase A-mangel, hvor nevnte medikament er for administrasjon av en dose på mellom 0,1 til 0,3 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av et individ.

5

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Fabrys sykdom er en X-bundet arvelig lysosomlagringssykdom som kjenetegnes av alvorlig nyresvikt, angiokeratomaer og kardiovaskulære abnormaliteter omfattende en ventrikulær forstørrelse og mitralklaffinsuffisiens. Fabrys sykdom rammer også det perifere nervesystem og forårsaker episoder med kvalfulle, brennende smerter i

10 ekstremitetene. Fabrys sykdom forårsakes av en mangel i enzymet α -galaktosidase (α -Gal A). α -Gal A er det lysosomale glykohydrolase som spalter de terminale α -galaktosylenheter av forskjellige glykokonjugater. Fabrys sykdom fører til en blokkering av katabolismen av det neutrale glykosfingolipid, ceramid triheksosid (CTH), og en oppsamling av dette enzymsubstrat i celler og i blodstrømmen.

15 Grunnet det X-bundne arvelighetsmønster av sykdommen er de fleste pasienter med Fabrys sykdom menn. Selv om alvorlig rammede kvinnelige heterozygoter er blitt observert, er kvinnelige heterozygoter ofte asymptomatiske eller har relativt svake symptomer (såsom en karakteristisk flekk på hornhinnen). En atypisk variant av Fabrys sykdom som oppviser en lav restaktivitet av α -Gal A og enten meget

20 svake symptomer eller tilsynelatende ingen andre symptomer som er karakteristiske for Fabrys sykdom, korrelerer med venstre ventrikkelhypertrofi og hjertesykdom. Nakano *et al.*, *New Engl. J. Med.* 333: 288-293 (1995). En reduksjon av α -Gal A-mengden kan være årsaken til slike hjerteabnormaliteter.

Humant α -Gal A har blitt rensset fra plasma og milt.(Desnick *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA 76: 3526(1979)).

25

cDNA og genet som koder for humant α -Gal A, er blitt isolert og sekvensiert. Humant α -Gal A uttrykkes som et 429 aminosyrer langt polypeptid, hvorav de 31 N-terminale aminosyrer er signalpeptidet. Det humane enzym er blitt uttrykt i kinesisk hamster-ovarieceller (CHO-celler) (Desnick *et al.*, US-patent 5.356.804;

30 Desnick *et al.* Europeisk patentsøknad EP 1020528; Ioannou *et al.*, *J. Cell. Biol.* 119: 1137 (1992)) humane celler (Selden *et al.*, internasjonal patentsøknad WO/98/11206, og insektceller (Calhoun *et al.*, WO 90/11353).

Konjugat av superoksyd-dismutase har blitt fremstilt ved å koble polyetylenglykol (Saifer et al., US-patent nr. 5.283.317).

Imidlertid har dagens preparater av α -Gal A en begrenset virkning. Fremgangsmåter ved fremstilling av α -Gal A med en relativt høy renhet er avhengige av bruk av affinitetskromatografi ved bruk av en kombinasjon av lektin-affinitetskromatografi (conavalin A (Con A)-"Sepharse") og affinitetskromatografi basert på bindingen av α -Gal A til substratanalogen N-6-aminoheksanoyl- α -D-galaktosylamid koblet til en "Sepharse"-matriks. Se f.eks. Bishop et al., *J. Biol. Chem.* 256: 1307-1316 (1981). Anvendelse av proteinholdige lektin-affinitetsharpikser og substratanalogharpikser er vanligvis forbundet med en kontinuerlig utvasking av affinitetsmidlet fra den faste bærer (Marikar et al., *Anal. Biochem.* 201: 306-310 (1992), hvilket fører til en forurensning av det rensede produkt med affinitetsmidlet, enten fritt i oppløsning eller bundet til eluert protein. Slike forurensninger gjør produktet uegnet for bruk i farmasøytiske preparater. Bundne substratanaloger og lektiner kan også ha en betydelig negativ virkning på de enzymatiske, funksjonelle og strukturelle egenskaper av proteiner. Videre elimineres α -Gal A som er fremstilt ved dagens metoder, raskt av leveren.

Dermed er det egnet å benytte en renseprotokoll ved bruk av konvensjonelle kromatografiharpikser som er lett tilgjengelige i en mengde og kvalitet som er egnet for kommersiell anvendelse i stor skala og som daner et α -Gal A-preparat som er fritt for affinitetsmiddel. Ved dette kan det fremstilles α -Gal A-preparater med en økt sirkulasjonshalveringstid og et økt opptak i bestemte vev, unntatt leveren.

SAMMENFATNING AV OPPFINNELSEN

Oppfinnelsen tilveiebringer anvendelse av α -Gal A-preparater for fremstilling av medikamenter som angitt i krav 1. Slike α -Gal A-preparater kan ha endret ladning. Ladningsendringer kan oppnås ved å øke sialyreinnholdet av α -Gal A og/eller ved å øke fosforylasjonen av α -Gal A. Det kan også benyttes α -Gal A-preparater som har en forlenget sirkulasjonshalveringstid i en pattedyrvert. De aktuelle α -Gal A-preparatene vil være nyttige for behandling av individer med Fabrys sykdom eller atypiske varianter av Fabrys sykdom, f.eks. bestemte grupper av Fabry-pasienter med overveiende kardiovaskulære abnormaliteter, såsom ventrikulær forstørrelse, f.eks. venstre ventrikelhypertrofi (LVH) og/eller mitralklaffinsuffisiens, eller Fabry-pasienter med overveiende nyrrammelse.

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Fig. 1 viser 210 bp-proben som ble brukt for å isolere et α -Gal A-cDNA fra en human fibroblast-cDNA-samling (SEKV. ID NR: 1). Sekvensen er fra ekson 7 av α -Gal A-genet. Proben ble isolert fra humant genomisk DNA ved polymerase-
5 kjedereaksjon (PCR). Områdene som er understreket på figuren, tilsvarer sekvensene av amplifikasjonsprimerne.

Fig. 2 viser sekvensen av DNA-fragmentet som fullfører 5'-ende av α -Gal A-cDNA-klonen (SEKV. ID NR: 2). Dette fragment ble amplifisert fra humant genomisk DNA ved PCR. Områdene som er understreket, tilsvarer sekvensene av amplifi-
10 kasjonsprimerne. Posisjonene av NcoI- og SacII-restriksjonsendonukleasetene, som ble brukt for delkloning beskrevet i eksempel 1, vises også.

Fig. 3 viser sekvensen av α -Gal A-cDNA, også sekvensen som koder for signalpeptidet (SEKV. ID NR: 3).

Fig. 4 er et skjematisk kart over pXAG-16, et α -Gal A-ekspresjonskonstrukt som
15 omfatter CMV (cytomegalovirus)-promoter, ekson 1 og det første intron, hGH-signalpeptid-kodende sekvens og første intron, cDNA for α -Gal A (som mangler α -Gal A-signalpeptidsekvensen) og hGH-3'-UTS. pcDNeo viser til posisjonen av neogenet som ble avledet fra plasmidet pcDNeo.

Fig. 5 er et skjematisk kart over pXAG-28, et α -Gal A-ekspresjonskonstrukt som
20 omfatter kollagen I α 2-promoter og det første ekson, et β -aktin-intron, hGH-signalpeptid-kodende sekvens og første intron, cDNA for α -Gal A (som mangler α -Gal A-signalpeptidsekvensen) og hGH-3'-UTS. pcDNeo viser til posisjonen av neogenet som ble avledet fra plasmidet pcDNeo.

Fig. 6 viser human α -Gal A-aminosyresekvens (SEKV. ID NR: 4).

25 Fig. 7 viser cDNA-sekvensen som koder for humant α -Gal A (uten signalpeptid) (SEKV. ID NR: 5).

Fig. 8 er et akromatogram av α -Gal A-rensetrinnet ved bruk av butyl-"sepharose"-harpiks. Absorbansen ved 280 nm (enkel strek) og α -Gal A-aktivitet (stiplet linje) av valgte fraksjoner vises.

Fig. 9 er et skjematisk kart over pGA213C.

Fig. 10 viser diagrammatisk målrettingskonstruktet pGA213C og en homolog rekombinasjon med endogent α -galaktosidase A-lokus. pGA213C vises som målrettingssekvenser linjestilt over de tilsvarende sekvenser på X-kromosomal α -galaktosidase A-lokus. Posisjoner i forhold til metionin-initierende kodon, ATG, vises med tallene ovenfor de lineære kart. Aktiveringsenheten som inneholder murint dhfr, bakterielt neo og CMV-promoter/aldolase-intronsekvenser, vises ovenfor posisjonen (-221) som de ble innføydd i ved DNA-kloning. α -galaktosidase A-kodende sekvenser vises med de mørke boksene. Ikke-kodende genomiske sekvenser vises med de svakt skyggelagte boksene. Store pilspisser angir retningen av transkripsjonen for dhfr og neo-ekspressjonskassetten. En skjøting av GA-GAL-mRNA etter en fremgangsrik målretting og genaktivering vises med den segmenterte linjen under kartet for aktivert α -galaktosidase A (GA-GAL)-lokus.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

15 Innledning

Det er beskrevet heri visse α -Gal A-preparater, fremgangsmåter ved fremstilling av dem, samt anvendelse av slike for fremstilling av medikamenter til behandling av pasienter med Fabrys sykdom eller atypiske varianter av Fabrys sykdom. Visse interessante og representative utførelser skal oppsummeres og beskrives i større detalj i det følgende.

Oppfinnelsen benytter seg av α -Gal A fremstilt i hvilken som helst celle (en α -Gal A-produksjonscelle) for fremstilling av medikamenter til behandling av Fabrys sykdom. I en foretrukken utførelse benytter seg oppfinnelsen av humant α -Gal A fremstilt ved bruk av standard genkonstruksjonsteknikker (basert på innføring av det klonede α -Gal A-gen eller cDNA inn i en vertcelle) eller genaktivering.

Oppfinnelsen anvender preparater, som inneholder α -Gal A av høy renhet. Det kan anvendes sammensetninger med humane α -Gal A-preparater fortrinnsvis med minst 98% homogenisitet, mer foretrukket til minst 99% homogenisitet og mest foretrukket til minst 99,5% homogenisitet, ifølge målinger ved SDS-PAGE eller reversfase-HPLC. Den spesifikke aktivitet av α -Gal A-preparatene er fortrinnsvis minst $2,0 \times 10^6$ enheter pr. mg protein, mer foretrukket minst $3,6 \times 10^6$ enheter pr. mg protein og mest foretrukket minst $3,5 \times 10^6$ enheter pr. mg protein.

Det aktuelle α -Gal A-preparatet kan renses ved å adskille de forskjellige glykoformer for α -Gal A fra andre komponenter på en hydrofob vekselvirkningsharpiks, men dette omfatter ikke noe lektin-kromatografisk trinn. Fortrinnsvis omfatter den funksjonelle enhet av den hydrofobe vekselvirkningsharpiks en butylgruppe.

- 5 Alternativt renses α -Gal A-preparatet ved å først binde de forskjellige glykoformer for α -Gal A til en kationbyttedharpiks i en kolonne ved sur pH i ekvibreringsbuffer. Kolonnen vaskes deretter med ekvibreringsbufferen for å eluere det ubundne materiale, og de forskjellige glykoformer for α -Gal A elueres ved bruk av en saltoppløsning på 10-100 mM, en bufret oppløsning med pH 4-5 eller en kombinasjon derav som elueringsoppløsning. Ekvibreringsbufferen kan ha en pH på ca. 4,4.

- 15 α -Gal A-preparat kan også renses ved å separere de forskjellige glykoformer av α -Gal A i en prøve fra de øvrige komponenter i prøven ved bruk av en renseprosedyre omfattende et trinn med minst én metode valgt fra kromatofokuserende kromatografi, metallchelat-affinitetskromatografi og immunoaffinitetskromatografi, som renseprosedyre.

Det kan videre anvendes α -Gal A-preparater som har α -Gal A med endret ladning. Preparatene kan omfatte forskjellige glykoformer for α -Gal A. Ladningsendringene oppnås ved å øke sialyreinnholdet i α -Gal A-preparater og/eller ved å heve fosforylasjonen av α -Gal A-preparater.

- 20 Sialyreinnholdet i α -Gal A-preparater økes ved å (i) isolere α -Gal A-glykoformene med høy ladning og/eller høyere molekylvekt under eller etter renseprosessen; (ii) tilsette sialyresiduer ved bruk av celler som er blitt genetisk modifisert (enten ved konvensjonelle genkonstruksjonsmetoder eller genaktivering) til å uttrykke et sialyltransferase-gen eller -cDNA; eller (iii) fermentere eller dyrke celler som uttrykker enzymet i et lavt ammoniumholdig miljø.

Fosforylering av α -Gal A-preparater kan heves ved å (i) tilsette fosfatresiduer ved bruk av celler som er blitt genetisk modifisert (enten ved konvensjonelle genkonstruksjonsmetoder eller genaktivering) til å uttrykke et fosforyltransferasegen eller -cDNA; eller (ii) tilsette fosfataseinhibitorer til de dyrkede celler.

- 30 Det kan foretrukket anvendes humane glykosylerte α -Gal A-preparater hvor mellom 35% og 85% av oligosakkaridene er ladet, og helst hvor minst 35% av oligosakkaridene

dene er ladet og enda mer foretrukket hvor minst 50% av oligosakkaridene er ladet.

Alternative foretrukne preparater av humant glykosylert α -Gal A har flere α -Gal A-glykoformer med fortrinsvis minst 20%, mer foretrukket minst 50% og mest foretrukket minst 70% komplekse glykaner med 2-4 sialyreresiduer. I en alternativ foretrukken utførelse har preparater av humant glykosylert α -Gal A med flere glykoformer, en oligosakkaridladning, målt ifølge Z-tallet, over 100, fortrinnsvis over 150 o mer foretrukket over 170. I en annen alternativ foretrukken utførelse er i preparatene med flere glykoformer, 50-75%, fortrinnsvis 60% av de samlede glykaner sialylert.

I én utførelse kan det anvendes et glykosylert α -Gal A-preparat som har en hevet oligosakkaridladning. Dette kan fremstilles ved å først innføre et polynukleotid som koder for GlcNAc-transferase III (GnT-III), i en α -Gal A-produksjonslinje, eller innføre en regulatorisk sekvens som regulerer ekspresjonen av et endogent GnT-III-gen, ved homolog rekombinasjon. α -Gal A-produksjonslinjen dyrkes deretter under kulturbetingelser som fører til en ekspresjon av α -Gal A og GnT-III. Til slutt kan α -Gal A-preparatet med hevet oligosakkaridladning isoleres.

Alternativt kan det anvendes et glykosylert α -Gal A-preparat som har en hevet oligosakkaridladning, hvor dette preparat er fremstilt ved å først innføre et polynukleotid som koder for sialyltransferase, i en α -Gal A-produksjonscelle, eller innføre en regulatorisk sekvens som regulerer ekspresjonen av et endogent sialyltransferasegen, ved homolog rekombinasjon. α -Gal A-produksjonscellen dyrkes deretter under kulturbetingelser som fører til ekspresjon av α -Gal A og sialyltransferaset. Det endelige trinn omfatter å isolere α -Gal A-preparatet med hevet oligosakkaridladning. Foretrukne sialyltransferaser omfatter et α 2,3-sialyltransferase og et α 2,6-sialyltransferase. I en foretrukken utførelse kan det utføres det ytterligere trinn å velge α -Gal A-glykoformer med økt størrelse eller økt ladning, ved fraksjonering eller rensing av preparatet.

Det kan også benyttes et glykosylert α -Gal A-preparat med økt sialylering hvor preparatet er fremstilt ved å bringe en α -Gal A-produksjonscelle i berøring med et kulturmedium som har en ammoniumkonsentrasjon under 10 mM, mer foretrukket under 2 mM. Det lavt ammoniumholdige miljø kan oppnås ved tilsetning av glutaminsyntetase til kulturmediet, eller det lavt ammoniumholdige miljø kan oppnås ved kontinuerlig eller tidvis perfusjon av α -Gal A-produksjonscellen med ferskt kul-

turmedium for å holde ammoniumkonsentrasjonen under 10 mM, mer foretrukket under 2 mM.

Det kan også anvendes et glykosylert α -Gal A-preparat med økt fosforylasjon hvor dette er fremstilt ved å først innføre et polynukleotid som koder for fosforyltransferase, i en α -Gal A-produksjonscelle, eller innføre en regulatorisk sekvens som regulerer ekspresjonen av et endogent fosforyltransferasegen, ved homolog rekombinasjon. α -Gal A-produksjonscellen dyrkes deretter under kulturbetingelser som fører til en ekspresjon av α -Gal A og fosforyltransferase. α -Gal A-preparatet med økt fosforylasjon sammenlignet med α -Gal A fremstilt i en celle uten polynukleotidet, isoleres deretter. α -Gal A-preparatene har flere glykoformer, hvor mellom 16-50%, fortrinnsvis 25-50%, mer foretrukket minst 30%, av glykoformene er fosforylert. Det er også mulig ytterligere å velge α -Gal A-glykoformer med økt størrelse eller økt ladning, ved fraksjonering eller rensing av preparatet.

Det kan også anvendes et glykosylert α -Gal A-preparat med økt fosforylasjon. Dette kan fremstilles ved å tilsette en fosfataseinhibitor, f.eks. bromtetramisol, til dyrkede celler. Lave nivåer av bovint plasma-alkalifosfatase kan foreligge i det føtale kalveserum som brukes som vekstadditiv for dyrkede celler. Dette gjør det mulig at utsatte Man-6-P-epitoper på utsondret α -Gal A kunne være et substrat for serumalkalifosfatase. Bromtetramisol har vist seg å være en sterk inhibitor av alkalifosfatase; $K_i = 2,8$ mM (Metaye *et al.*, *Biochem. Pharmacol* 15: 4263-4268 (1988)), og en fullstendig inhibering oppnås ved en konsentrasjon på 0,1 mM (Borgers & Thone, *Histochemistry* 44: 277-280 (1975)). Derfor kan en fosfataseinhibitor, f.eks. bromtetramisol, tilsettes til de dyrkede celler, for å maksimere formen av α -Gal A med høyt opptak som foreligger i kulturmediet, ved å forebygge en hydrolyse av Man-6-P-estergruppene.

De aktuelle α -Gal A-preparater, har en forlenget sirkulasjonshalveringstid i en pattedyrvert. Sirkulasjonshalveringstiden og det cellulære opptak forsterkes ved å (i) øke sialyreinnholdet i α -Gal A (oppnås som beskrevet ovenfor); (ii) øke fosforylasjonen av α -Gal A (oppnås som beskrevet ovenfor); (iii) PEGylere α -Gal A; eller (iv) sekvensielt fjerne sialyre og terminale galaktoseresiduer, eller fjerne terminale galaktoseresiduer, på oligosakkaridkjedene på α -Gal A.

En forbedret sialylering av α -Gal A-preparater øker sirkulasjonshalveringstiden av eksogent α -Gal A. I tillegg fører en forbedret sialylering av α -Gal A til et forbedret opptak sammenlignet med opptaket av hepatocytter, i ikke-hepatocytter såsom le-

verendotelceller, leversinusoidceller, pulmonære celler, nyreceller, neuralceller, endotelceller eller hjerteceller. Preparatet med humant glykosylert α -Gal A med et økt innhold av sialsyre, omfatter fortrinnsvis flere glykoformer, med minst 20% komplekse glykaner som har 2-4 sialsyresiduer. Et alternativt foretrukket preparat av humant glykosylert α -Gal A har flere glykoformer, hvor mellom 50-70%, fortrinnsvis mist 60%, av de samlede glykaner er sialylert.

Fosforylasjon av α -Gal A-preparater forbedrer også nivået av α -Gal A som inntreffer i cellene. Fosforylasjonen finner sted i cellene som uttrykker α -Gal A. Et foretrukket preparat av humant glykosylert α -Gal A omfatter fortrinnsvis flere glykoformer hvor gjennomsnittlig minst 16-50%, fortrinnsvis 25-50%, mer foretrukket minst 30%, av glykoformene er fosforylert.

Det er også mulig å forbedre sirkulasjonshalveringstiden av et humant α -Gal A-preparat ved å kompleksere α -Gal A med polyetylenglykol. Således komplekseres α -Gal A-preparatet ved bruk av tresylmonometoksy-PEG (TMPEG) for å danne et PEGylert α -Gal A. Det PEGylerte α -Gal A renses deretter for å tilveiebringe et isolert, PEGylert α -Gal A-preparat. PEGyleringen av α -Gal A øker sirkulasjonshalveringstiden og *in vivo*-effekten av proteinet.

Sialylering påvirker sirkulasjonshalveringstiden og biofordelingen av proteiner. Proteiner med lite eller ingen sialsyre internaliseres raskt av asialoglykoproteinreseptor (Ashwell-reseptor) på hepatocytter av fremviste galaktoseresiduer på proteinet. Sirkulasjonshalveringstiden av galaktoseterminert α -Gal A kan forsterkes ved å sekvensielt (1) fjerne sialsyre ved å bringe α -Gal A i berøring med neuraminidase (sialidase), hvilket blottlegger de terminale galaktoseenheter, og (2) fjerne de terminale galaktosidaseresiduer ved å bringe det desialylerte α -Gal A i berøring med β -galaktosidase. Det dannede α -Gal A-preparat har et antall terminale sialsyre- og/eller terminale galaktosid-residuer på oligosakkaridkjedene sammenlignet med α -Gal A-preparater som ikke er blitt bragt i sekvensiell berøring med neuraminidase og β -galaktosidase. Alternativt kan sirkulasjonshalveringstiden av galaktoseterminert α -Gal A forbedres ved å kun fjerne de terminale galaktosidresiduer ved å bringe det desialylerte α -Gal A i berøring med β -galaktosidase. Det dannede α -Gal A-preparat har et nedsatt antall terminale galaktosidresiduer på oligosakkaridkjedene sammenlignet med α -Gal A-preparater som ikke er blitt bragt i berøring med β -galaktosidase. I en foretrukket utførelse bringes, etter en sekvensiell berøring med neuraminidase og β -galaktosidase, de dannede α -Gal A-preparater

deretter i berøring med β -heksosaminidase, hvilket spalter oligosakkaridet til trimannose-kjernen.

I tillegg kan sialyleringsnivået variere avhengig av hvilken celletype som brukes. Derfor kan sialyleringen av α -Gal A forsterkes ved å teste for pattedyrceller, f.eks. humane celler, som har en relativt høy sialyltransferaseaktivitet, og å bruke slike celler som α -Gal A-produksjonsceller.

Det er ved anvendelsen ifølge oppfinnelsen mulig å benytte formuleringer av et α -Gal A-preparat som er i det vesentlige frie for ikke- α -Gal A-proteiner såsom albumin, ikke-atal-proteiner fremstilt i vertcellen eller proteiner isolert fra dyrevev eller -væske. Formuleringen kan i tillegg omfatte en eksipiens. Foretrukne eksipienser omfatter mannitol, sorbitol, glycerol, aminosyrer, lipider, EDTA, EGTA, natriumklorid, polyetylenglykol, polyvinylpyrrolidon, dekstran eller kombinasjoner av disse eksipienser. Formuleringen kan i tillegg omfatte et ikke-ionisk rensmiddel. Foretrukne ikke-ioniske rensmidler omfatter Polysorbat 20, Polysorbat 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, Oktyl a-glukosid, Oktyl b-glukosid, Brij 35, Pluronic og Tween 20. Alternativt omfatter det ikke-ioniske rensmiddel Polysorbat 20 eller Polysorbat 80. En alternativ formulering omfatter ytterligere fosfatbufret salin, fortrinnsvis ved pH 6.

Administrasjonsdosen av det fremstilte medikamentet er fortrinnsvis mellom 0,05-5,0 mg, mer foretrukket mellom 0,1-0,3 mg, α -Gal A-preparat pr. kg kroppsvekt ukentlig eller annenhver uke. Fortrinnsvis er administrasjonsdosen ca. 0,2 mg pr. kg kroppsvekt annenhver uke. Dosen kan administreres intramuskulært, oralt, rektalt, subkutant, intraarterielt, intraperitonealt, intracerebralt, intranasalt, intradermalt, intratekalt, transmukosalt, transdermalt eller ved inhalasjon. α -Gal A-preparatet kan tilpasses å subkutant administrere en dose i området mellom 0,01-10,0 mg, fortrinnsvis 0,1-5,0 mg, α -Gal A-preparat pr. kg kroppsvekt annenhver uke eller ukentlig. α -Gal A-preparatet kan også administreres intravenøst eller ved en kontinuerlig intravenøs injeksjon. I hvilken som helst av de ovennevnte metoder kan α -Gal A-preparatet leveres ved bruk av et leveringssystem såsom pumpelevering, innkapslet celle-levering, liposomal levering, nållevert injeksjon, nålløs injeksjon, forstøver, aerosoliserer, elektroporasjon og transdermalt plaster. Hvilket som helst av de ovenfor beskrevne α -Gal A-preparater kan administreres ved disse metoder.

α -Gal A

α -Gal A er et homodimert glykoprotein som hydrolyserer de terminale α -galaktosylenheter fra glykolipider og glykoproteiner.

Begrepene modent " α -Gal A" og "GA-GAL" og "SEKV. ID NR: 5" (se fig. 7) viser til
5 α -Gal A uten signalpeptid (for α -Gal A med signalpeptidet, se fig. 3 og SEKV. ID NR: 3). Begrepet " α -Gal A-preparat" som definert heri, benyttes synonymt med begrepet "glykosylert α -Gal A-preparat" og omfatter forskjellige glykosylerte α -Gal A-glykoformer.

Et "signalpeptid" er en peptidsekvens som styrer et nytt syntetisert polypeptid som
10 signalpeptidet er bundet til, mot endoplasmatisk retikulum (ER) for videre post-translasjonell prosessering og fordeling.

Et "heterologt signalpeptid" betyr når det brukes heri i sammenheng med α -Gal A, et signalpeptid som ikke er humant α -Gal A-signalpeptid, vanligvis signalpeptidet for et annet pattedyrprotein enn α -Gal A.

15 Fagmannen vil forstå at den humane α -Gal A-DNA-sekvens (enten cDNA [SEKV. ID NR: 5] eller genomisk DNA), eller sekvenser som skiller seg fra humant α -Gal A-DNA grunnet enten stumme kodonendringer eller kodonendringer som fører til konservative aminosyreendringer, kan brukes for å genetisk modifisere dyrkede humane celler slik at disse vil overuttrykke og utsondre enzymet. Visse mutasjoner i
20 α -Gal A-DNA-sekvensen kan kode for polypeptider som bevarer eller oppviser forbedret α -Gal A-enzymatisk aktivitet. For eksempel ville man forvente at konservative aminosyresubstitusjoner vill ha liten eller ingen virkning på den biologiske aktivitet, spesielt hvis de representerer færre enn 10% av det samlede antall residuer i proteinet. Konservative substitusjoner omfatter vanligvis substitusjoner i de følgende
25 grupper: glycin, alanin; valin, isoleucin, leucin; asparaginsyre, glutamsyre; asparagin, glutamin; serin, treonin; lysin, arginin; og fenylalanin, tyrosin. Se f.eks. US-patent 5.356.804.

Fabrys sykdom

Fabrys sykdom er en genetisk forstyrrelse som forårsakes av en manglende aktivitet
30 av enzymet α -Gal A. Med " α -Gal A-mangel" menes hvilken som helst mangel i mengden eller aktiviteten av dette enzym i en pasient som fører til abnormale opp-

hopninger av neutrale glykolipider (f.eks. globotriaosylceramid) i histiocytter i blodkarvegger, med angiokeratomaer på hoftene, baken og genitaliene, hypohidrose, parastesi i ekstremitetene, cornea verticillata og knottlignende posteriore subkapsulære katarakter. Avsettelsene av dette materiale kan føre til smerter, alvorlig nyresykdom og kardiovaskulær sykdom samt slag. Glykolipidopphopningen kan indu-
 5 sere alvorlige symptomer som typisk kan observeres i menn som lider av Fabrys sykdom. Alternativt kan opphopningen indusere relativt svake symptomer, slik de iblant kan observeres i heterozygote kvinnelige bærere av det defekte gen. Rammede individer kan ha en meget kort livsforventning; døden skyldes vanligvis
 10 nyre-, hjerte- eller cerebrovaskulære komplikasjoner i omkring 40 års alder. Det finnes ingen spesiell behandling for denne sykdom. Fabrys sykdom, som klassifiseres som en lysosomal lagringsforstyrrelse, rammer over 15.000 mennesker i verden.

Fabrys sykdom som definert ovenfor er et komplekst klinisk syndrom som kjenne-
 tegnes av flerorgan- og flersystem-innblanding. Pasienter som manifesterer kombi-
 15 nasjonen av korneal dystrofi, hudlesjoner (angiokeratomata), smertelig neuropati, cerebral vaskulær sykdom, kardiomyopati og nyresvikt, kategoriseres som å oppvise den "klassiske" fenotype. Det finnes imidlertid også pasienter som oppviser noen av, men ikke alle, aspektene av den klassiske fenotype. Disse pasienter klassifiseres som "atypiske varianter av Fabrys sykdom". Det finnes flere atypiske variantfe-
 20 notyper forbundet med α -galaktosidase A-mangel. F.eks. har noen pasienter med α -galaktosidase A-mangel en variasjon av Fabrys sykdom med kun hjerterammelse, f.eks. venstre ventrikulær hypertrofi (LVH). Det finnes også en annen variantfenotype hvor pasientene kun har en nyrerammelse. Selv om begge disse variantfenotyper er blitt definert i manlige hemizygoter, er variantformene for Fabrys sykdom også blitt beskrevet i kvinnelige heterozygoter.
 25

Pasienter med den atypiske hjertevariant har generelt en symptomatisk sykdom senere i livet. Den midlere diagnosealder for pasienter med hjertevariantfenotypen er ca. 52 år, sammenlignet med ca. 29 år for den klassiske fenotype (Desnick *et al.*, i The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 6. utgave (1996),
 30 Scriver *et al.* (utg.), McGraw-Hill (New York), s. 2741-2784; Meikle *et al.*, *J. Am. Med. Assoc.* 281: 249-254 (1999)). Pasienter med dette syndrom viser seg generelt å ha svake symptomer av hjertedysfunksjon såsom anstrengelsesdyspné. Vanligvis viser en standard ekkokardiografisk analyse at pasienter med hjertevariantfenotype har venstre ventrikulær hypertrofi (LVH) eller asymmetrisk septal hypertrofi. Imidlertid kan pasientene også vise seg å ha myokardialt infarkt eller kardiomyopati
 35 (Scheidt *et al.*, *New Engl. J. Med.* 324: 395-399 (1991); Nakao *et al.*, *New Engl. J.*

Med. 333: 288-293 (1995)). Disse pasienter gjennomgår ofte myokardiale biopsier, og patologien av variantsyndromet er i det vesentlige likt den klassiske Fabrys sykdom: myokardial infiltrasjon av avsatt glykolipid. α -galaktosidase A-enzymassayer viser et bredt område for enzymnivået. F.eks. har hjertevariantpasienter blitt

5 beskrevet å ha opptil 30% av det normale nivå for α -galaktosidase a-aktivitet og har inntil idag ikke blitt ansett å være kandidater for α -Gal A-erstatningsterapi.

Oppfinnerne har nå overraskende oppdaget at selv om atypiske hjertevariant- eller atypiske nyrevariantpasienter kan ha α -galaktosidase A-enzym-aktivitetsnivåer som er relativt høye sammenlignet med pasienter med klassisk fenotype av Fabrys syk-

10 dom, kan også disse pasienter ha nytte av en α -galaktosidase A-enzymterapi. F.eks. kan pasienter ha en mutasjon som danner et kinetisk ustabilt α -Gal A-enzym i cellen, og i disse pasienter kan α -Gal A-enzymnivået forsterkes vesentlig ved administrasjon av et α -Gal A-preparat anvendt ifølge foreliggende oppfinnelse. Dessuten er det blitt beskrevet at noen pasienter med den atypiske hjerte-

15 variantfenotype har en punktmutasjon i aminosyre 215 av α -galaktosidase A. Denne aminosyre i det umuterte protein er et asparagin som er glykosylert (Eng *et al.*, *Am. J. Hum. Genet. 53: 1186-1197 (1993)*). Dermed kan en α -Gal A-enzym-erstatningsterapi med et ordentlig glykosylert α -galaktosidase A-preparat være virksomt i disse pasienter. Videre er det blitt beskrevet pasienter med atypisk nyre-

20 variant, hvis eneste kliniske manifestasjon av Fabrys sykdom er en svak proteinuria. En renal biopsi viser imidlertid de for Fabrys sykdom typiske glykolipidoppsamlinger, og et α -Gal A-enzymassay viser lavere α -Gal A-nivåer enn normalt. På grunn av at avsatt ceramidtriheksosid i nyren kan påvises i utskilte nyretubuliceller i urinsedimentet av disse pasienter, kan en administrasjon av et α -Gal A-preparat ned-

25 sette dette nivå betydelig. Lysosomale enzymer såsom α -Gal A målrettes mot det lysosomale rom i en celle ved vekselvirkning med mannose-6-fosfat (M6P)-reseptor, som bindes til M6P-residuer som foreligger i oligosakkaridenheten av enzymer på vei til det lysosomale rom. Kornfeld & Mellman, *Ann. Rev. Cell Biol. 5: 483-525 (1989)*. Den primære vekselvirkning finner sted i Golgi, hvor enzymer som

30 er bundet til Golgi-M6P-reseptorer adskilles for en transport til lysosomene. En sekundær type av vekselvirkning antas å finne sted mellom ekstracellulært α -Gal A og M6P-reseptorene på celleflaten. Enzymer som ikke tas opp i rutesystemet, utsondres av cellen via den konstitutive sekretoriske bane, og gjeninnfanges ofte av celleflate-M6P-reseptorer, som tilbakefører α -galaktosidase A til lysosomet via den eno-

35 cytiske bane. Ekstracellulære substanser som internaliseres av celler, transporteres gjennom cytoplasma i endocytiske vesikler, som sammensmelter med primære lysosomer og tømmer sitt innhold i lysosomene. I denne prosess innlemmes cellelev-

flate-M6P-reseptorer også i endocytiske vesikler, og transporteres til lysosomer. Spesielt er det aktuelt å bruke α -Gal A-preparater hvor det foreligger høye nivåer av sialylering og/eller fosforylering, for behandling av pasienter med atypiske varianter av Fabrys sykdom. Slike preparater minimerer f.eks. andelen av det injiserte α -Gal A som fjernes av hepatocytene, og muliggjør et høyt nivå av α -Gal A-opptak i ikke-lever-celler, såsom nyreceller, vaskulære celler, tubuliceller, glomerulære celler, hjertemyocytter og hjertevaskulære celler.

Ekstracellulært α -Gal A som bærer M6P-residuer, kan bindes til celleflate-M6P-reseptorer og transporteres inn i det lysosomale rom. Når de befinner seg i det lysosomale rom, kan α -Gal A utføre den riktige funksjon. Det er dette trekk av lysosomal enzymbevegelse som gjør α -galaktosidase A-enzym-erstatningsterapi til en tenkelig terapeutisk behandling for pasienter med Fabrys sykdom. Selv om en celle har en genetisk mangelfull produksjon av α -Gal A, kan cellen ta opp ekstracellulært α -Gal A hvis α -Gal A er glykosylert på egnet måte, og den manglende celle bærer M6P-reseptorer. I pasienter med Fabrys sykdom oppviser de vaskulære endotelceller i nyre og hjerte alvorlige histopatologiske abnormaliteter og bidrar til den kliniske patologi av sykdommen. Disse celler, som bærer M6P-reseptorer, er et spesielt terapeutisk mål for α -Gal A.

I hvilken grad de N-bundne oligosakkarider av α -Gal A modifiseres ved sialylering, har en betydelig virkning på α -Gal A's farmakokinetikk og biofordeling. I fravær av en egnet sialylering, utskilles α -Gal A raskt fra sirkulasjonen fordi de bindes til hepatiske asialoglykoproteinreseptorer (Ashwell-reseptorer), fult av en internalisering og degradering av hepatocytter. Ashwell & Harford, *Ann. Rev. Biochem.* 51: 531-554 (1982). Dette nedsetter mengden av α -Gal A som er tilgjengelig i sirkulasjonen for binding til M6P-reseptorer på celler som bidrar til den kliniske patologi av Fabrys sykdom, såsom de vaskulære endotelceller i nyre og hjere. α -Gal A som utsondres av genetisk modifiserte humane celler, har glykosylasjonsegenskaper som er egnet for behandling av Fabrys sykdom ved enten en konvensjonell farmasøytisk administrasjon av det rensede utsondrede protein eller ved genterapi, uten at det er nødvendig med noen ytterligere enzymatisk modifikasjon, slik som hva som er blitt beskrevet å være nødvendig for det lysosomale enzym glukocerebrosidase, hvor opptaket av rensed glukocerebrosidaseenzym av de klinisk relevante celler krever en komplisert enzymatisk modifikasjon av enzymet etter rensing fra human placenta. Beutler, *New Engl. J. Med.* 325: 1354-1360 (1991).

Celler som er egnet for produksjon av α -Gal A

Et individ som man tror at har en α -Gal A-mangel såsom Fabrys sykdom, kan behandles med rensset humant α -Gal A erholdt fra dyrkede, genetisk modifiserte celler, fortrinnsvis humane celler.

- 5 Når celler skal modifiseres genetisk for behandling av Fabrys sykdom, kan cellene modifiseres ved konvensjonelle genkonstruksjonsmetoder eller ved genaktivering.

Ifølge konvensjonelle metoder kan et DNA-molekyl som inneholder et α -Gal A-cDNA eller en genomisk DNA-sekvens, føyes inn i et ekspresjonskonstrukt og transiseres inn i primære, sekundære eller udødeliggjorte celler ved standardmetoder, omfattende liposom-, polybren- eller DEAE-dekstran-mediert transfeksjon, elektroporasjon, kalsiumfosfatfelning, mikroinjeksjon eller hastighetsdrevne mikroprojektiler ("biolistika") (se f.eks. en samtidig svevende søknad, USSN 08/334.797). Alternativt kunne man bruke et system som leverer den genetiske informasjon via en viral vektor. Viruser som er kjent for å være nyttige ved genoverføring, omfatter 10 adenoviruser, adenoforbundet virus, herpesvirus, kusmavirus, poliovirus, retroviruser, Sindbis-virus og vacciniavirus såsom kanariepoxvirus. 15

Alternativt kan cellene modifiseres ved bruk av fremgangsmåten med genaktivering ("GA"), slik som beskrives i US-patentene 5.733.761 og 5.750.376, begge innlemmet heri ved henvisning. α -Gal A fremstilt ved genaktivering, benevnes heri 20 GA-GAL.

Følgelig skal begrepet "genetisk modifisert" slik det brukes heri under henvisning til celler, omfatte celler som uttrykker et bestemt genprodukt etter innføring av et DNA-molekyl som koder for genproduktet og/eller regulatoriske elementer som regulerer ekspresjonen av en kodende sekvens for genproduktet. DNA-molekylet kan 25 innføres ved genmåletting eller homolog rekombinasjon, dvs. innføring av DNA-molekylet i et bestemt genomisk sete. En homolog rekombinasjon kan brukes til å erstatte selve det defekte gen (det defekte α -Gal A-gen eller en del derav kunne erstattes i en Fabry-pasients egne celler med hele genet eller en del derav).

Anvendt heri omfatter begrepet "primær celle" celler som foreligger i en suspensjon 30 av celler isolert fra en kilde for virveldyrvev (før de strykes på plate, dvs. festes på et vevkultursubstrat såsom en skål eller kolbe), celler som foreligger i et eksplantat

avldet fra vev, hvor begge de sistnevnte celletyper strykes på plater for første gang, og celsuspensjoner avledet fra disse platepåstrøkne celler.

"Sekundære celler" viser til celler i et senere dyrkingstrinn. Dvs. at den første gang en platepåstrøken celle fjernes fra kultursubstratet og strykes på en plate på nytt (passeres), benevnes den en sekundær celle, slik som også alle celler i senere pas-
 5 sasjer.

En "cellestamme" består av sekundære celler som er blitt passert én eller flere ganger, oppviser et endelig antall midlere populasjonsfordoblinger under kultur; oppviser egenskaper med kontakthemmet, forankringsavhengig vekst (unntatt cel-
 10 ler som forøkes i suspensjonskultur og som ikke er blitt gjort udødeliggjort).

Med "udødeliggjort celle" menes en celle fra en etablert cellelinje som oppviser en tilsynelatende ubegrenset livsvarighet i kultur.

Eksempler på primære eller sekundære celler omfatter fibroblaster, epitelceller om-
 fattende bryst- og tarmepitelceller, endotelceller, formede elementer av blod om-
 15 fattende lymfocytter og benmargceller, glialceller, hepatocytter, keratinocytter, muskelceller, neurale celler eller forløpere for disse celletyper. Eksempler på udøde-
 liggjorte humane cellelinjer omfatter Bowes Melanomaceller (ATCC-tilgangsnummer CRL 9607), Daudi-celler (ATCC-tilgangsnummer CCL 213), HeLa-celler og derivater
 av HeLa-celler (ATCC-tilgangsnumre CCL 2, CCL 2.1 og CCL 2.2), HL-60-celler
 20 (ATCC-tilgangsnummer CCL 240), HT-1080-celler (ATCC-tilgangsnummer CCL 121), Jurkat-celler (ATCC-tilgangsnummer TIB 152), KB-karsinomaceller (ATCC-
 tilgangsnummer CCL 17), K-562-lekuemiceller (ATCC-tilgangsnummer CCL 243), MCF-7-brystkreftceller (ATCC-tilgangsnummer BTH 22), MOLT-4-celler (ATCC-
 tilgangsnummer 1582), Namalwa-celler (ATCC-tilgangsnummer CRL 1432), Raji-
 25 celler (ATCC-tilgangsnummer CCL 86), RPMI 8226-celler (ATCC-tilgangsnummer CCL 155), U-937-celler (ATCC-tilgangsnummer CRL 1593), WO-38VA13-underlinje
 2R4-celler (ATCC-tilganganummer CLL 75.1), CCRF-CEM-celler (ATCC-
 tilganganummer CCL 119). og 2780AD-ovariekarsinomaceller (Van der Blick *et al.*,
Cancer Res. 48: 5927-5932, 1988) samt heterohybridomaceller dannet ved fusjon
 30 av humane celler og celler av en annen art.

Etter den genetiske modifikasjon av humane celler for å danne en celle som ut-
 sondrer α -Gal A, kan en klonal cellestamme som i det vesentlige består av et flertall
 genetisk identiske dyrkede primære humane celler, eller, når cellene er udødelig-

gjort, en klonal cellelinje som i det vesentlige består av et flertall genetisk identiske udødeliggjorte humane celler, genereres. I én utførelse er cellene av den klonale cellestamme eller klonale cellelinje fibroblaster, eller sekundære humane fibroblaster, f.eks. BRS-11-celler.

- 5 Etter genetisk modifikasjon, dyrkes cellene under betingelser som tillater en utsondring av α -Gal A. Proteinet isoleres fra de dyrkede celler ved å samle mediet hvor cellene dyrkes, og/eller spalte cellene for å frigi deres innhold, og å deretter anvende proteinrenseteknikker.

Rensing av α -Gal A fra det kondisjonerte medium av stabilt transfiserte celler

- 10 α -Gal A-protein fra de dyrkede celler (" α -Gal A-produksjonsceller") kan isoleres ved å samle mediet som cellene dyrkes i, eller spalte cellene for å frigi deres innhold, og deretter anvende proteinrenseteknikker uten bruk av lektin-affinitetskromatografi. Den foretrukne renseprosess sammenfattes i det følgende eksempel 2.

- Alternativt kan også hydrofobe vekselvirkningsharpikser, såsom Source Iso (Pharmacia), "Macro-Prep" Methyl Support (Bio-Rad), TSK Butyl (Tosohaas) eller fenyl-
 15 "Sephacrose" (Pharmacia) brukes til å rense α -Gal A. Kolonnen kan ekvilibrerres i en relativt høy konsentrasjon av et salt, f.eks. 1 M ammoniumsulfat eller 2 M natriumklorid, i en buffer med pH 5,6. Prøven som skal renses, prepareres ved å justere pH og saltkonsentrasjonen tilpasset hva som foreligger i ekvilibreringsbufferen. Prøven
 20 påføres på kolonnen, og kolonnen vaskes med ekvilibreringsbuffer for å fjerne ubundet materiale. α -Gal A elueres fra kolonnen med en buffer med lavere ionisk styrke, vann eller et organisk løsemiddel i vann, f.eks. 20% etanol eller 50% propylenglykol. Alternativt kan α -Gal A fås til å flyte gjennom kolonnen ved bruk av en lavere saltkonsentrasjon i ekvilibreringsbufferen og i prøven, eller ved bruk av en
 25 annen pH. Andre proteiner kan bindes til kolonnen, hvilket fører til en rensing av den α -Gal A-holdige prøve som ikke ble bundet til kolonnen. Et foretrukket første rensetrinn er bruk av en hydroksyapatittkolonne.

- Et alternativt rensetrinn kan benytte seg av en kationbytteharpiks, f.eks. SP-
 "Sephacrose" 6 Fast Flow (Pharmacia), Source 30S (Pharmacia), CM-"Sephacrose"
 30 Fast Flow" (Pharmacia), "Macro-Prep" CM Support (Bio-Rad) eller "Macro-Prep" High S Support (Bio-Rad) for å rense α -Gal A. Det "første kromatografitrinn" er den første påføring av en prøve på en kromatografikolonne (alle trinnene forbundet med prepareringen av prøven utelukkes). α -Gal A kan bindes til kolonnen ved pH 4,4. En

buffer, såsom 10 mM natriumacetat pH 4,4, 10 mM natriumcitrat pH 4,4 eller en annen buffer med egnet bufringskapasitet ved ca. pH 4,4 kan også brukes for å ekvilibrere kolonnen. Prøven som skal renses, justeres til pH og den ioniske styrke av ekvibreringsbufferen. Prøven påføres på kolonnen, og kolonnen vaskes etter

5 påfyllingen for å fjerne ubundet materiale. Et salt, såsom natriumklorid eller kaliumklorid, kan brukes for å eluere α -Gal A fra kolonnen. Alternativt kan α -Gal A elueres fra kolonnen med en buffer med høyere pH eller en kombinasjon av en høyere saltkonsentrasjon og høyere pH. α -Gal A kan også fås til å flyte gjennom kolonnen under påfyllingen ved å øke saltkonsentrasjonen av ekvibreringsbufferen og i prøv

10 vefyllet, ved å skylle kolonnen ved en høyere pH eller ved en kombinasjon av både økt saltmengde og høyere pH.

Et annet rensetrinn kan benytte seg av en Q-"Sephacrose" 6 Fast Flow for rensing av α -Gal A. Q-"Sephacrose" 6 fast Flow er en relativt sterk anionbytteharpiks. En svakere anionbytteharpiks, såsom dEAE "Sephacrose" Fast Flow (Pharmacia) eller

15 "Macro-Prep" DEAB (Bio-Rad) kan også brukes for å rense α -Gal A. Kolonnen ekvibreres i en buffer, f.eks. 10 mM natriumfosfat, pH 6. pH i prøven justeres til pH 6, og en lav ionstyrke oppnås ved fortykning eller diafiltrering av prøven. Prøven påføres på kolonnen under betingelser som binder α -Gal A. Kolonnen vaskes med ekvibreringsbuffer for å fjerne ubundet materiale. α -Gal A elueres ved påføring av salt,

20 f.eks. natriumklorid eller kaliumklorid, eller anvendelse av en buffer med lavere pH, eller en kombinasjon av økt saltmengde og lavere pH. α -Gal A kan også fås til å flyte gjennom kolonnen under fyllingen ved å øke saltkonsentrasjonen i fyllet eller ved å skylle kolonnen ved lavere pH, eller ved en kombinasjon av økt saltmengde og lavere pH.

25 Et annet rensetrinn kan benytte seg av "Superdex" 200 (Pharmacia) størrelseseksklusjonskromatografi for rensing av α -Gal A. Andre størrelseseksklusjonsharpikser såsom "Sephacryl" S-200 HR eller "Bio-Gel" A-1,5 m kan også benyttes for å rense α -Gal A. Den foretrukne buffer for størrelseseksklusjonskromatografi er 25 mM natriumfosfat pH 6,0 som inneholder 0,15 M natriumklorid. Andre formuleringskompatible buffere kan også brukes, f.eks. 10 mM natrium- eller kaliumcitrat.

30 pH av bufferen kan være mellom pH 6 og pH 7, og bør inneholde et salt, f.eks. natriumklorid eller en blanding av natriumklorid og kaliumklorid.

Et annet rensetrinn kan benytte seg av en kromatofokuserende harpiks såsom Polybuffer Exchanger PBE 94 (Pharmacia) for å rense α -Gal A. Kolonnen ekvibreres ved relativt høy pH (f.eks. pH 7 eller mer), pH av prøven som skal renses, justeres

35

til den samme pH, og prøven påføres på kolonnen. Proteiner elueres med en synkende pH-gradient til en pH såsom pH 4, ved bruk av et buffersystem, f.eks. Polybuffer 74 (Pharmacia), som er blitt justert til pH 4.

Alternativt kan immunoaffinitetskromatografi benyttes for å rense α -Gal A. Et egnet polyklonalt eller monoklonalt antistoff mot α -Gal A (generert ved immunisering med α -Gal A eller med et peptid avledet fra α -Gal A-sekvensen ved bruk av standard teknikker) kan immobiliseres på en aktivert koblingsharpiks, f.eks. NHS-aktivert "Sephacrose" 5 Fast Flow (Pharmacia) eller CNBr-aktivert "Sephacrose" 4 Fast Flow (Pharmacia). Prøven som skal renses, kan påføres på den immobiliserte antistoffkolonne ved ca. pH 6 eller pH 7. Kolonnen vaskes for å fjerne ubundet materiale. α -Gal A elueres fra kolonnen med typiske reagensmidler som benyttes for affinitetskolonneeluering, såsom lav pH, f.eks. pH 3, denatureringsmiddel, f.eks. guanidin-HCl eller tiocyanat, eller organisk løsemiddel, f.eks. 50% propylenglykol i en pH 6-buffer. Renseprosedyren kan også benytte seg av en metallchelate-affinitetsharpiks, f.eks. Chelating "Sephacrose" Fast Flow (Pharmacia) for å rense α -Gal A. Kolonnen forhåndslades med metallioner, f.eks. Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} eller Cd^{2+} . Prøven som skal renses, påføres på kolonnen ved egnet pH, f.eks. pH 6 til 7,5, og kolonnen vaskes for å fjerne ubundne proteiner. De bundne proteiner elueres ved kompetitiv eluering med imidazol eller histidin eller ved å nedsette pH ved bruk av natriumcitrat eller natriumacetat til en pH under 6, eller ved å innføre chelateringsmidler, såsom EDTA eller EGTA.

I henhold til de ovennevnte protokoller tilveiebringes preparater med renere ag-preparat enn hva som er blitt fremstilt tidligere, renses til minst 98% homogenisitet, mer foretrukket til minst 99% homogenisitet og mest foretrukket til minst 99,5% homogenisitet, ifølge målinger ved SDS-PAGE eller reversfase-HPLC. α -Gal A-preparatene anvendt ifølge foreliggende oppfinnesle kan omfatte flere α -Gal A-glykoformer. Følgelig viser begrepet "homogenisitet" slik det brukes i sammenheng med α -Gal A-preparater, til preparater som er i det vesentlige frie (< 2% av de samlede proteiner) for andre proteiner enn α -Gal A. Eksempler på ikke- α -Gal A-proteiner såsom albumin, ikke- α -Gal A-proteiner som fremstilles av vertcellen, og ikke- α -Gal A-proteiner isolert fra dyrevæv eller -væske. Den spesifikke aktivitet av α -Gal A-preparatene er fortrinnsvis minst $2,0 \times 10^6$ enheter pr. mg protein, mer foretrukket minst $3,0 \times 10^6$ enheter pr. mg protein og mest foretrukket minst $3,5 \times 10^6$ enheter pr. mg protein.

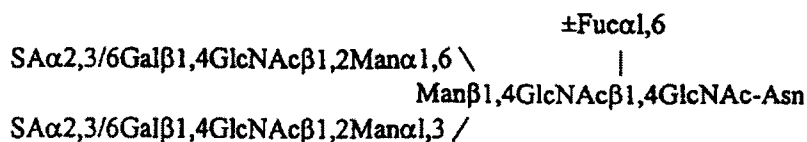
Forbedring av sirkulasjonshalveringstiden av α -Gal A-preparater ved glykanommodellering for å øke oligosakkaridladningen

Preparatet fremstilt ved anvendelsen ifølge oppfinnelsen kan benytte et glykoproteinmodifikasjonsprogram for et økt opptak av et terapeutisk enzym i bestemte andre vev enn lever og makrofager. Det anvendes humane glykosylerte α -Gal A-preparater hvor mellom 35% og 85% av oligosakkaridene er ladet, fortrinnsvis hvor minst 50% av oligosakkaridene er ladet.

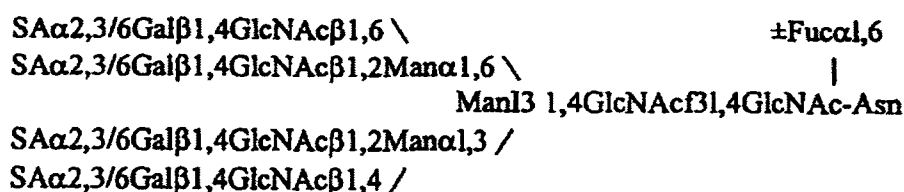
Protein N-glykosylasjon virker ved å modifisere egnede asparaginresiduer av proteiner med oligosakkaridstruktur, hvorved deres egenskaper og bioaktivitet påvirkes. Kukuruzinska & Lennon, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 9: 415-448 (1998). Det kan således benyttes et isolert α -Gal A-preparat hvor en høy prosentdel av oligosakkaridene er negativt ladet, primært ved tilsetning av ett til fire sialyresiduer på komplekse glykaner, ett eller to fosfatenheter på høyt mannoseholdige glykaner, eller ett enkelt fosfat og en enkelt sialyre på hybride glykaner. Mindre mengder sulfaterte komplekse glykaner kan også foreligge. En høy andel ladede strukturer tjener to hovedfunksjoner. For det første vil en avkapping av nestsiste galaktoseresiduer med 2,3- eller 2,6-bundet sialyre forebygge en for tidlig fjerning fra sirkulasjonen ved innvirkning av asialoglykoproteinreseptor som foreligger på hepatocytter. Denne reseptor gjenkjenner glykoproteiner med terminale galaktoseresiduer. En økt sirkulasjonshalveringstid av α -Gal A gir viktige målorganer såsom hjertet og nyren anledning til å endocytose større mengder av enzym fra plasma etter enzyminfusjonen. For det andre vil nærværet av Man-6-fosfat på høyt mannoseholdige eller hybride glykaner muliggjøre et reseptormediert opptak via kationuavhengig Man-6-fosfatreseptor (CI-MPR). Dette reseptormederte opptak finner sted på overflaten av mange celler, bl.a. vaskulære endotelceller, som er et viktig opphopningssted for CTH i pasienter med Fabrys sykdom. Enzymmolekyler med to Man-6-fosfatresiduer har en meget større affinitet for CI-MPR enn slike med ett enkelt Man-6-fosfat. Representative glykanstrukturer vises i tabell 1.

Tabell 1
Representative glykanstrukturer

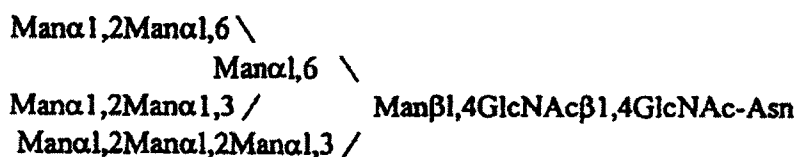
Et biantennært glykan:



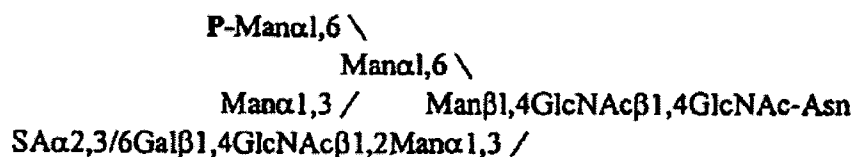
5 Et tetraantennært glykan:



Et høyt mannoseholdig glykan:

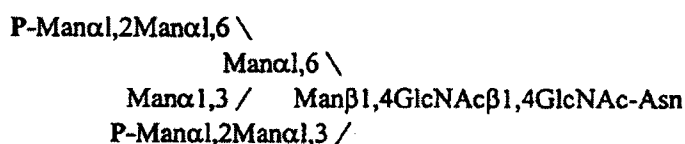


Et fosforylert hybrid glykan:



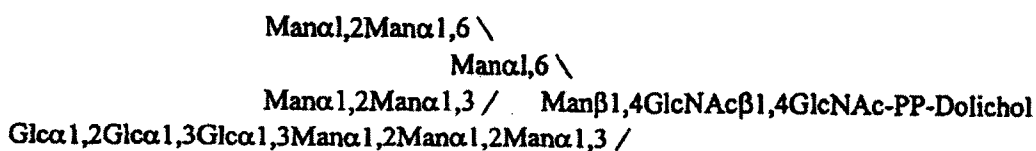
10

Et bifosforylert glykan:



N-glykoproteinbiosyntese omfatter flere enzymer, glykosyltransferaser og glykosidaser. Hovedparten av disse enzymer virker i endoplasmatisk retikulum (ER) og Golgi-apparatet på ordnet og velorganisert måte. Kompleksiteten av N-glykosyleringen forsterkes av at forskjellige asparaginresiduer i ett og samme polypeptid kan modifiseres med forskjellige oligosakkaridstrukturer, og forskjellige proteiner skiller seg fra hverandre ved egenskapene av sine karbohydratenheter. Nylige fremskritt innen den molekylære genetik har fremmet identifikasjonen, isolasjonen og karakteriseringen av N-glykosylasjonsgener. Som et resultat har det kommet frem informasjon om forholdet mellom N-glykosylasjon og andre cellulære funksjoner.

N-bundet glykoproteinprosessering i cellen starter når en oligosakkaridkjede med et $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ tilsettes til et mottakerasparagin på et vordende peptid i lumen av ER som en enkelt enhet. En fjorten sukkers oligosakkaridkjede bestående av $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ bygges opp på dolikol, en meget langkjedet alifatisk alkohol:



15

Dette oligosakkarid overføres som en enkelt enhet til et akseptor-asparaginresiduum på en vordende peptidkjede i lumen av ER. Den store størrelse av glykkanet i forhold til peptidet kan styre proteinfoldingen. De tre glukoseresiduer tjener som signal for at oligosakkaridet er fullstendig og klart for overføring ved hjelp av oligosakkaryltransferase. Dette enzym vil også overføre ikke-glukosylerte oligosakkarider, men bare med en brøkdel av raten for den fullførte kjede, fordi dette er suboptimale substrater. Én form for karbohydratmanglende glykoprotein-syndrom har vist seg å forårsakes av en mangel på dolikol-P-Glc: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -PP-dolikolglukosyltransferase, det første enzym i glukosetilsetningsbanen, hvilket fører til en hypoglykosylasjon av serumproteiner. Korner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13200-13205 (1998). Etter fjerning av de tre glukoseresiduer og når den riktige konformasjon er oppnådd, eksporteres det nylig syntetiserte glykoprotein til Golgi. Avhengig av tilgjengeligheten av glykkanet for Golgi-mannosidaser etter proteinfoldingen, kan glykankjeden holde seg som en høyt mannoseholdig kjede med 5-9 mannoseresiduer. Alternativt kan glykankjeden videreprosesseres til en trimanosylkjerne og bli en mottaker for ytterligere glykosyltransferaser, som danner

30

komplekse kjeder ved tilsetning av flere GlcNAc-residuer, fulgt av Gal, NeuAc og Fuc. En tredje mulighet, hvis proteinet har to lysinresiduer nøyaktig 34 Ångstrøm fra hverandre og i det riktige romforhold til en høyt mannoseholdig kjede, er tilsetning av GlcNAc α -1-PO₄ på karbon 6 av ett, eller iblant to, mannoseresiduer. Cuozzo *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273: 21069-21076 (1998). Etter fjerning av det α -bundne

5 GlcNAc med et bestemt enzym, genereres en terminal M6P-epitop som gjenkjennes av en M6P-reseptor i trans-Golgi-nettet, som deretter målretter disse enzymer mot lysosomer i celler av mesenkynt opphav.

For å målrette α -Gal A mot så mange forskjellige vev som mulig, er det nyttig med

10 mange forskjellige karbohydratstrukturer (glykoformer). Matsuura *et al.*, *Glycobiology* 8: 329-339 (1998) beskrev at glykanstrukturene på humant α -Gal A fremstilt i CHO-celler hadde 41% høyt mannoseholdige glykaner, og at fosforylasjonsnivået var 24%. Imidlertid var mengden av sialylerte komplekse glykaner kun 11%. Dermed ble 2/3 av de komplekse kjeder ikke sialylert, hvilket fører til en rask elimine-

15 ring av α -Gal A i leveren. α -Gal A fremstilt i de humane celler ifølge oppfinnelsen har en høyere prosentdel ladete oligosakkarider enn α -Gal A i teknikkens stand som er fremstilt i CHO-celler. F.eks. er α -Gal A fremstilt i HT-1080-celler som beskrevet heri, spesielt godt egnet, fordi α -Gal A fremstilt i HT-1080-celler inneholder ca. 15% nøytrale strukturer (høyt mannoseholdige og hybride), ca. 16% fosfo-

20 rylerte glykaner og ca. 67% komplekse glykaner med 2 til 4 sialyreresiduer. dermed sialyleres i det vesentlige alle de komplekse kjeder, sammenlignet med α -Gal A fremstilt i CHO-celler. HT-1080-celle- α -Gal A har tre N-bundne glykosylasjonsseter. To seter prosesseres til komplekse glykaner i Golgi-apparatet, mens det tredje sete opptas av et høyt mannoseholdig glykan, hvorav 50% modifiseres ved lysosomal enzymspesifikk fosforylering for å gi både monofosforylerte og difosforylerte

25 arter.

Fire fremgangsmåter tilveiebringes for karbohydrat-ommodellering på et protein som inneholder N-bundne glykankjeder. For det første kan andelen av ladet α -Gal A økes ved selektiv isolasjon av glykoformer under renseprosessen. Forbindelser med

30 en øket andel av høyt ladete α -Gal A-glykoformer med høyere molekylvekt kan fremskaffes ved fraksjonering av α -Gal A-artene på kromatografikolonneharpikser under og/eller etter renseprosessen. Den mer høyt ladete glykoformart av α -Gal A inneholder mer sialyre og/eller mer fosfat, og glykoformene med høyere molekylvekt ville også inneholde de fullstendig glykosylerte, mest sterkt forgrenede og høyt

35 ladete arter. Utvalg av de ladete arter, eller fjerning av de ikke-glykosylerte, dårlig glykosylerte eller dårlig sialylerte og/eller fosforylerte α -Gal A-arter ville føre til en

populasjon av α -Gal A-glykoformer med mer sialsyre og/eller mer fosfat, hvilket ville gi et α -Gal A-preparat med lengre halveringstid og potensielt bedre terapeutisk virkning.

5 Fraksjoneringsprosessen kan utføres på egnede kromatografiske kolonneharpikser som brukes for å rense eller isolere α -Gal A. F.eks. kan en fraksjonering utføres på kationbyttelharpikser (såsom SP-"Sephacrose"), anionbyttelharpikser (Q-"Sephacrose"), affinitetsharpikser (Heparin-"Sephacrose", lektinkolonner), størrelses-
10 eksklusjonskolonner ("Superdex" 200) og hydrofobe vekselvirkningskolonner (butyl-"sephacrose") og andre kromatografiske kolonneharpikser som er kjent innen faget.

Fordi α -Gal A produseres i celler som en heterogen blanding av glykoformer med forskjellig molekylvekt og ladning, tenderer α -Gal A til å eluere i relativt brede topp-
15 per fra kromatografiharpiksen. Under disse elueringer er glykoformene fordelt på bestemt måte avhengig av naturen av harpiksen som brukes. F.eks. vil på størrelses-
seksklusjonskromatografi, de største glykoformene tendere til å eluere tidligere på elueringsprofilen enn de mindre glykoformer.

Ved ionbyttetekromatografi vil de mest negativt ladede glykoformer tendere til å bin-
des til en positivt ladet harpiks (såsom Q-"Sephacrose") med en høyere affinitet enn
20 de mindre negativt ladede glykoformer, og vil derfor tendere til å eluere senere i elueringsprofilen. derimot kan disse høyt negativt ladede glykoformer bindes mindre
svakt til en negativt ladet harpiks, såsom SP-"Sephacrose", enn mindre negativt
ladede arter, eller bindes eventuelt ikke i det hele tatt.

Fraksjoneringen av glykoformartene på kromatografiske harpikser kan påvirkes av
25 pH, den ioniske styrke, valget av buffersalt, viskositet og/eller andre parametre, såsom valget av harpikstype. Bruk av forskjellige typer gradientelueringer (rettlin-
jede lineære gradienter, krunnede, f.eks. eksponensielle gradienter) eller anvendelse
av en rekke korte trinn-elueringer for å selektivt eluere α -Gal A-arter fra kroma-
tografikolonnen, kan også optimeres for en α -Gal A-fraksjonering. Alle disse faktorer,
30 alene eller i kombinasjon, kan optimeres for å oppnå en virksom fraksjonering av glykoformene. Fraksjonering kan også finne sted etter at renseprosessen er full-
ført, på en bestemt kromatografisk harpiks som er selektivt optimert for fraksjone-
ring og valg av den ønskede glykoformpopulasjon.

Valget av glykoformpopulasjoner fra de fraksjonerte α -Gal A-arter kan foretas etter analyse av de eluerte α -Gal A-glykoformer. Elueringstoppen kan analyseres ved forskjellige teknikker, så som SDS-PAGE, isoelektrisk fokusering, kapillær elektroforese, analytisk ionbytte-HPLC og/eller analytisk størrelsesseksklusjons-HPLC. Bestemte fraksjoner kan velges som tenderer mot den ønskede størrelse eller ladningsprofil. Valget kan foretas under hvert kromatografiske trinn under prosessen, hvilket muliggjør en gradvis oppnåelse av den ønskede glykoformpopulasjon, eller kan begrenses til ett eller flere bestemte trinn hvis effekten av fraksjoneringstrinnet(ene) er høy. Fraksjoneringen kan også finne sted etter at renseprosessen er fullført, på en bestemt kromatografisk harpiks som er selektivt optimert for fraksjonering og valg av den ønskede glykoformpopulasjon.

Fraksjonering og valg av glykoformer av α -Gal A med høy ladning og/eller høy molekylvekt kan utføres på hvilket som helst α -Gal A-preparat, såsom hva som erholdes fra genetisk modifiserte celler, såsom celler somer blitt modifisert ved konvensjonelle genkonstruksjonsmetoder eller ved genaktivering (GA). Det kan utføres på cellelinjer dyrket i optimerte systemer for å gi en høyere sialylering og fosforylasjon som beskrevet ovenfor, eller på PEGylert α -Gal A som skal beskrives i det følgende.

F.eks. i α -Gal A-rekseprosessen som beskrives heri, kan en fraksjonering av α -Gal A-glykoformer utføres under forskjellige trinn i prosessen. På den hydrofobe harpiks butyl-"sepharose" Fast Flow, elueres de sterkest ladede α -Gal A-glykoformer først, fulgt av de mindre sterkt ladede arter. For Heparin-"Sepharose" elueres de sterkest ladede arter også først i elueringstoppen, fulgt av de mindre sterkt ladede arter. Det motsatte finner sted med Q-"Sepharose", hvor den minst sterkt ladede art elueres først, fulgt av de mest sterkt ladede glykoformer. Ved størrelsesseklusjonskromatografi på "Superdex" 200 elueres glykoformene med høyest molekylvekt først, fulgt av de mindre glykosylerte α -Gal A-arter med lavere molekylvekt. For å muliggjøre en effektiv fraksjonering av bestemte α -Gal A-glykoformpopulasjoner kan flere kromatografiske trinn kombineres, som alle fraksjonerer basert på forskjellige fysiske metoder. For å f.eks. erholde α -Gal A-glykoformene som inneholder minst pI (de som har den mest negative ladning), ville en begrensnings av oppsamlingen til de tidlig eluerte butylfraksjoner fremme det mer sterkt ladede α -Gal A. Idet man fortsetter med denne valgte samling på en Heparin-kolonne, og igjen begrenset oppsamlingen til de tidligere, mer sterkt negativt ladede α -Gal A-arter, økes andelen av lavt pI- α -Gal A-glykoformer i samlingen ytterligere. Ytterligere finjustering av glykoformpopulasjonen kan utføres under forskjellige trinn i renseprosessen ved å overvåke størrelses- og ladningsfordelingen

av elueringssamlingene ved SDS-PAGE og isoelektrisk fokusering. Et eksempel på en fraksjonering ifølge størrelse og ladning sammenfattes i det følgende i eksempel 2.4.

Den andre fremgangsmåte ved karbohydrat-ommodellering omfatter å modifisere visse glykoformer på det rensede α -Gal A ved å feste et ytterligere terminalt sukkerresiduum ved bruk av et rensed glykosyltransferase og den egnede nukleotid-sukkerdonor. Denne behandling påvirker kun slike glykoformer som har et egnet fritt terminalt sukkerresiduum for å virke som mottaker for glykosyltransferaset som skal brukes. F.eks. tilfører α 2,6-sialyltransferase sialsyre i en 2,6-binding på en terminal Ga1 β 1,5GlcNAc-R-mottaker ved bruk av CMP-sialysre som nukleotid-sukkerdonor. Handelstilgjengelige enzymer og deres opphavsart omfatter: fukose- α 1,3-transferasene III, V og VI (humane); galaktose- α 1,3-transferase (porkint); galaktose- β 1,4-transferase (bovint); mannose- α 1,2-transferase (gjær); sialsyre- α 2,3-transferase (rotte) og sialsyre- α 2,6-transferase (rotte). Etter at reaksjonen er fullført, kan glykosyltransferaset fjernes fra reaksjonsmediet ved hjelp av en glykosyltransferase-spesifikk affinitetskolonne bestående av det egnede nukleotid bundet til en gel via en 6-karbon-avstandsholer med en pyrofosfat (GDP, UDP)- eller fosfat (CMP)-binding, eller ved andre kromatografiske metoder som er kjent innen faget. Av de ovennevnte glykosyltransferaser, er sialyltransferasene spesielt nyttige ved modifikasjon av enzymer, såsom α -Gal A, for enzymerstatningsterapi i humane pasienter. Anvendelse av enten sialyltransferase med CMP-5-fluoresceinylneuraminsyre som nukleotid-sukkerdonor gir et fluorescerende merket glykoprotein hvis opptak og vevplassering lett kan overvåkes.

Den tredje fremgangsmåte ved karbohydrat-ommodellering omfatter glyko-konstruksjon, f.eks. innføring av gener som påvirker cellens glykosylasjonsmekanismer, av α -Gal A-produksjonscellen for å modifisere den posttranslasjonelle prosessering i Golgi-apparatet er en foretrukken fremgangsmåte.

Den fjerde fremgangsmåte ved karbohydrat-ommodellering omfatter å behandle α -Gal A med egnede glykosidaser for å nedsette antallet forskjellige glykoformer som foreligger. For eksempel vil en sekvensiell behandling av komplekse glykankjeder med neuraminidase, β -galaktosidase og β -heksosaminidase spalte oligosakaridet til trimannosekjernen.

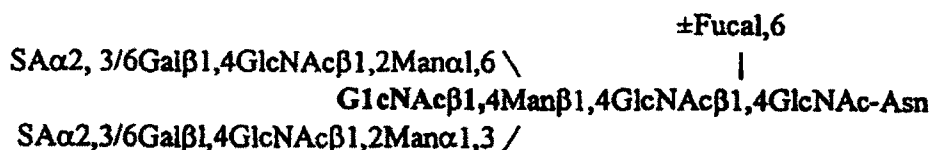
Strukturen av et N-bundet glykan er avhengig av glykankjedens tilgjengelighet for Golgi-prosesserende mannosidaser etter at proteinet har foldet seg, og nærværet i

Golgi av en familie av glykosyltransferaser og de egnede nukleotid-sukkerdonore. Mange av glykosyltransferasene katalyserer konkurrerende reaksjoner, hvilket kan føre til at glykankjeden forlenges på flere forskjellige og compatible måter, avhengig av hvilket enzym som reagerer først. dette fører til mikroheterogenitet og dan-

5 nelse av en kompleks familie av glykoformer. Noen strukturer er ensartede for et bestemt vev, såsom modifikasjonen av visse hypofysehormoner ved tilsetning av GalNAc-4-SO₄, eller er begrenset til noen få organer.

Et eksempel på sistnevnte er dannelse av et såkalt todeltende GlcNAc (GlcNAc-bundet β1,4 til kjerne-β-mannoseresiduet) på komplekse glykaner av glutamyltranspeptidase i nyren, men ikke i leveren. En todelt biantennær struktur på γ-glutamyltranspeptidase vises i det følgende:

10

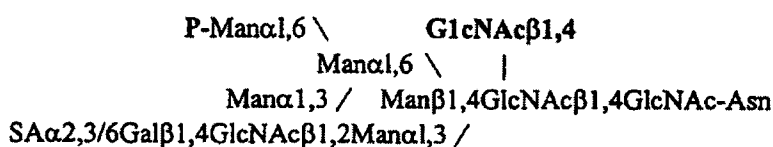


I pattedyr finnes det ansvarlige enzym, GlcNAc-transferase III (GnT-III), i visse celler i hjerne og nyre og i visse celler av leveren i pasienter med hepatokarsinomaer. GnT-III katalyserer tilsetningen av N-acetylglukosamin i β1-4-binding til det β-bundne mannose av trimannosylkjernen av N-bundne sukkerkjeder for å danne et todeltende GlcNAc-residuum. Muse-, rotte- og humane gener for GnT-III er blitt klonet. Ihara *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)* 113: 692-698 (1993).

15

Nærværet av ytterligere GlcNAcT-III-aktivitet i humane celler kan føre til et hevet antall monofosforylerte hybride glykaner på bekostning av bi-, tri- og tetraantennære komplekse glykaner. Dette skulle ikke påvirke plasmahalveringstiden på ugunstig måte, men kan øke målrettingen mot vaskulære endotelceller. En representativ struktur vises nedenfor:

20



Noe α -Gal A tas opp i nyren og fører til en betydelig nedsettelse av mengden lagret glykolipider. Fordi nyren kan danne N-glykaner med todelende GlcNAc-residuer, kan renale epitelceller gjenkjenne glykoproteiner med denne epitop med en spesielt høy spesifisitet.

- 5 En hevet GnT-III-aktivitet kan forårsake ubalanse i forgreningen på trimannosylkjernen ved å inhibere en ytterligere forgrening ved GnT-II, IV, V og Gal- β 1,4-transferase på substratnivå. Nylig ble en kinesisk hamsterovarie-cellelinje (CHO-cellelinje) som hadde evnen til å danne todelte oligosakkarider på glykoproteiner, dannet ved overekspresjon av rekombinant GnT-III. Sburlati *et al.*, *Biotechnol. Progr.* 14: 189-192 (1998). Interferon β (IFN- β) ble valgt som modell og potensielt terapeutisk utsondret heterologt protein som virkningen av GnT-III-ekspresjonen på produktglykosylasjonen kunne bedømmes på. IFN- β med todelte oligosakkarider ble dannet av de GnT-III-endrede CHO-celler, men ikke av den umodifiserte opphavscellelinje.
- 10
- 15 Produksjonen av glykoproteinterapeutika krever en karakterisering av glykosylasjonen med hensyn til ensartetheten av batcher. Den "hypotetiske N-glykanladning Z" er blitt brukt som parameter for å kjennetegne proteinglykosylasjonen på enkel og virksom måte. Bestemmelsen av Z er blitt validert i flere repetitive eksperimenter, og viste seg å være meget nøyaktig og pålitelig. Hermentin *et al.*, *Glycobiology* 6: 217-230 (1996). Den hypotetiske N-glykanladning av et gitt glykoprotein avledes fra N-glykan-kartleggingsprofilen som erholdes ved høytytelses anionbyttekromatografi (HPAEC)/pulserende amperometrisk påvisning (PAD). I HPAEC adskilles N-glykanene klart i henhold til sin ladning, dvs. deres antall sialyresiduer, hvilket gir klare områder for neutrale strukturer som for de mono-, di-, tri- og tetrasialylerte N-glykaner. Z defineres som summen av produktene av de aktuelle områder (A) i asialo-, monosialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- og pentasialoområdet, hver multiplisert med den tilsvarende ladning:
- 20
- 25

$$Z = A_{(\text{asialo})} \cdot 0 + A_{(\text{MS})} \cdot 1 + A_{(\text{DIS})} \cdot 2 + A_{(\text{TriS})} \cdot 3 + A_{(\text{TetraS})} \cdot 4 + A_{(\text{PentaS})} \cdot 5$$

$$Z = \sum A_{(i)} \cdot (i)$$

- 30 hvor I er 0 i asialoområde, 1 i monosialo (MS)-område, 2 i disialo (DIS)-område, 3 i trisialo (TriS)-område, 4 i tetrasialo (TetraS)-område og 5 i pentasialo (PentaS)-område.

Dermed vil et glykoprotein med hovedsakelig C4-4*-strukturer gi $Z \cong 400$, et glykoprotein som hovedsakelig bærer C2-2*-strukturer, vil gi $Z \cong 200$, og et glykoprotein som kun bærer høyt mannoseholdig type eller avkortede strukturer, vil gi $Z \cong 0$.

- 5 Humane glykosylerte α -Gal A-preparater anvendt ifølge foreliggende oppfinnelse har en oligosakkaridladning, målt i henhold til Z-tallet, over 100, fortrinnsvis over 150 og mer foretrukket over 170.

Endring av halveringstiden av serum- α -Gal A ved fosforylering

- 10 Fosforyleringen av α -Gal A kan endres for å påvirke sirkulasjonshalveringstiden av α -Gal A og mengden av α -Gal A som inntreffer i celler. Fosforyleringen oppnås fortrinnsvis i cellen som uttrykker α -Gal A. Spesielt tenker man her på å erholde et glykosylert α -Gal A-preparat med økt fosforylering ved å først innføre i en α -Gal A-produserende celle, en DNA-sekvens som koder for fosforyltransferase, eller ved å innføre en regulatorisk sekvens ved homolog rekombinasjon som regulerer ekspresjonen av et endeogent fosforyltransferasegen. α -Gal A-produksjonscellen dyrkes 15 deretter under kulturbetingelser som fører til ekspresjon av α -Gal A og fosforyltransferase. Isolasjon kan deretter utføres av α -Gal A-preparatet med økt fosforylering sammenlignet med α -Gal A fremstilt i en celle uten polynukleotidet. Slike fosforyltransferaser er velkjent innen faget. Se f.eks. US-patent 5.804.413 og 20 5.789.247.

- En felles virkning av to membranbundne Golgi-enzymmer er nødvendig for å generere en Man-6-fosfatgjenkjenningsmarkør på et lysosomalt proenzym. Det første, UDP-*N*-acetylglukosamin: glykoprotein-*N*-acetylglukosamin-1-fosfotransferase (GlcNAc-fosfotransferase), krever en proteingjenkjennelsesbestemmer på lysosomale enzymer som består av to lysinresiduer som er nøyaktig 34 Ångstrøm fra hverandre og 25 står i riktig romforhold til en høyt mannoseholdig kjede. Det andre, *N*-acetylglukosamin-1-fosfodiester *a*-*N*-acetylglukosaminidase (fosfodiester *a*-GlcNAcase), hydrolyserer α -GlcNAc-fosfatbindingen og blottlegger Man-6-fosfatgjenkjenningssettet.

- 30 I henhold til oppfinnelsen har α -Gal A-preparatene som anvendes flere glykoformer hvor mellom 16-50%, fortrinnsvis 25-50%, mer foretrukket minst 30%, av glykoformene er fosforylert.

Endringen av halveringstiden av serum- α -Gal A ved økt sialylering

En økt sialylering av undersialylerede glykaner med terminale galaktoseresiduer kan oppnås ved transfeksjon av pattedyrceller og fortrinnsvis humane celler med sialyltransferasegen.

- 5 Foreliggende oppfinnelse benytter et glykosylert α -Gal A-preparat som har en økt oligosakkaridladning, fremstilt ved å først innføre et polynukleotid som koder for sialyltransferase, i en α -Gal A-produserende celle, eller å innføre en regulatorisk sekvens ved homolog rekombinasjon som regulerer ekspresjonen av et endogent sialyltransferasegen. α -Gal A-produksjonslinjen dyrkes deretter under kulturbeting-
- 10 elser som fører til ekspresjon av α -Gal A og sialyltransferase. Det følgende trinn består i å isolere α -Gal A-preparatet med økt oligosakkaridladning. Foretrukne sialyltransferaser omfatter α 2,3-sialyltransferase og α 2,6-sialyltransferase. Disse sialyltransferaser er velkjent. Se f.eks. US-patent 5.858.751.

- 15 Ved heving av sialyleringen kan det benyttes det ytterligere trinn å velge ut α -Gal A-glykoformer som har økt størrelse eller økt ladning, ved fraksjonering eller rensing av preparatet (som skal diskuteres i det følgende).

- Alternativt kan sialyleringen økes ved å holde cellene i et lavt ammoniumholdig miljø. Spesielt erholdes et glykosylert α -Gal A-preparat med økt sialylering ved å
- 20 bringe en α -Gal A-produksjonscelle i berøring med et kulturmedium som har en ammoniumkonsentrasjon under 10 mM, mer foretrukket under 2 mM. En økt sialylering kan oppnås ved perfusjon av produksjonsceller, hvorved toksiske metabolitter, såsom ammoniakk, periodisk fjernes fra kulturmediet. Fortrinnsvis oppnås det lavt ammoniumholdige miljø ved tilsetning av glutaminsyntetasegen eller -cDNA til produksjonscellene. Alternativt oppnås det lavt ammoniumholdige miljø ved per-
- 25 fusjon av α -Gal A-produksjonscellen med ferskt kulturmedium for å holde ammoniumkonsentrasjonen under 10 mM, mer foretrukket under 2 mM. Produksjonscellene kan perfuseres kontinuerlig med ferskt kulturmedium med en ammoniumkonsentrasjon under 10 mM, mer foretrukket under 2 mM. Alternativt kan produksjonscellene perfuseres tidvis med ferskt kulturmedium. En tidvis perfusjon betyr,
- 30 slik det brukes heri, enten perfusjon i regelmessige, periodiske tidsintervaller eller etter at det er blitt målt at ammoniumkonsentrasjonen nærmer seg målkonsentrasjonen (dvs. 10 mM, mer foretrukket under 2 mM). De tidvise perfusjoner bør utføres tilstrekkelig ofte til at ammoniumkonsentrasjonen aldri overskrider målkonsentrasjonen. Produksjonscellene perfuseres over et tidsrom som er nødvendig for å

oppnå et α -Gal A-preparat hvor mellom 50-70%, fortrinnsvis 60%, av de samlede glykaner er sialylert.

Økning av sirkulasjonshalveringstiden av serum- α -Gal A ved PEGylering av α -Gal A

Sirkulasjonshalveringstiden av et humant glykosylert α -Gal A-preparat kan økes ved å kompleksere α -Gal A med polyetylenglykol. Poly(etylenglykol) (PEG) er en vannløselig polymer som når den er kovalent bundet til proteiner, endrer deres egenskaper på en måte som utvider deres potensielle anvendelsesområde. Polyetylenglykolmodifikasjon ("PEGylering") er en veletablert teknikk som har evnen til å løse eller mildne mange av problemene med protein- og peptidfarmasøytika.

Den forbedrede farmakologiske ytelse av PEG-proteiner sammenlignet med deres umodifiserte motparter ga anledning til utvikling av denne type konjugat som terapeutisk middel. Enzymmangler hvor en terapi med det native enzym var uvirksom (grunnet en rask utskilling og/eller immunologiske reaksjoner) kan nå behandles med tilsvarende PEG-enzym. F.eks. har PEG-adenosindeaminase allerede fått en FDA-godkjenning. Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9: 249-304 (1992).

Den kovalente binding av PEG til α -galaktosidase fra grønne kaffebønner endrer de katalytiske egenskaper av enzymet ved å maskere bestemte determinantseter på molekylet. Dette fører til en økt K_m -verdi og nedsatt V_{maks} -verdi mot p-nitrofenylsubstratanaloger. Wieder & Davis, *J. Appl. Biochem.* 5: 337-347 (1983). α -Galaktosidase kunne fortsatt spalte terminale galaktoseresiduer fra huma spyttblodgruppe-substans B. Antistoffbindingen og denne lektinspesifikke binding var tapt i PEG- α -galaktosidase. Antistoffer generert fra nativt α -galaktosidase kan blokkere enzymaktiviteten, og denne inhibering går gradvis tapt når man tester mot preparater av enzymet med progressivt større mengder PEG. Antisera fra dyr som var blitt immunisert med PEG- α -galaktosidase, inhiberte derimot ikke enzymaktiviteten i noe α -galaktosidase- eller PEG- α -galaktosidasepreparat. Disse resultater tyder på at PEG tenderer til å dekke over lektinspesifikke karbohydratenheter og antigendeterminanter, og at disse seter sannsynligvis holdes kryptiske under *in vivo*-prosesseringen av PEG-enzym.

En kovalent binding av PEG til proteiner krever en aktivering av den hydroksylterminale gruppe av polymeren med en egnet utgående gruppe som kan løses ved et nukleofilt angrep av ϵ -aminoterminal av lysin og α -aminogruppe av N-terminus. Fle-

re kjemiske grupper er blitt utnyttet for å aktivere PEG. For hver bestemte anvendelse gir forskjellige koblingsmetoder bestemte fordeler. Forskjellige PEGyleringsmetoder har en overraskende og dramatisk innvirkning på faktorer såsom rensjon av bioaktiviteten, stabiliteten og immunogenisiteten av de dannede PEGy-

5 lerte proteiner og peptider. Francis *et al.*, *Int. J. Hematol.* 68 (1): 1-18 (1998). F.eks. binder en bindemiddelløs PEGyleringsteknikk kun PEG til målmolekylet. Nærmere bestemt vil anvendelse av en biologisk optimert PEGyleringsteknikk ved bruk av tresylmonometoksy-PEG (TMPEG) på forskjellige målproteiner, slik det beskrives av Francis *et al.*, *Int. J. Hematol.* 68 (1): 1-18 (1998) gi en eksepsjonell

10 evne til å konservere den biologiske aktivitet av målet. Dette, og fordelene ved å ikke tilsette noe annet enn PEG (som har vist seg å være sikker i bruk i humante-rapeutika) til proteinet, gjør metoden ideell for modifikasjon av α -Gal A.

Fire mulige steder for kobling av PEG til proteiner er (1) aminogruppene (N-terminus og lysin); (2) karboksylgrupper (asparaginsyre og glutamsyre); (3) sulfn-

15 hydrylgrupper (cystein); og (4) karbohydratgrupper (aldehyder generert etter perjodatbehandling). Kobling til karboksylgruppene av proteiner og til aldehydgrupper på karbohydrater krever et PEG-reagensmiddel med en nukleofil aminogruppe. Denne kjemi endrer pI av α -Gal A etter at de negativt ladede karboksylgrupper bindes av PEG. Endringer i pI kan påvirke den biologiske aktivitet av α -Gal A. Videre

20 kan en kobling av PEG til karbohydratkjedene påvirke M6P-reseptors opptak av α -Gal A, hvilket er kritisk for en biologisk aktivitet. Sulfhydrylkjemien påvirker også den fysiske struktur av molekylet, og anbefales ikke.

Vanlige brukte PEGyleringsmetoder danner en amidbinding mellom aminogruppene av et protein og metoksygruppen på monometoksy-PEG. NHS-PEG er handelstil-

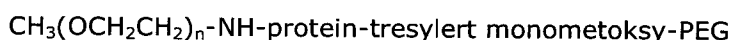
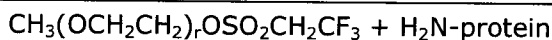
25 gjengelig, og fører til en amidbinding mellom proteinet og PEG. Imidlertid endrer amidbindingsdannelser pI-verdien grunnet tap av den positive ladning av -NH_2 -gruppen.

En fremgangsmåte for å koble PEG til α -Gal A uten å påvirke dets pI, benytter seg av tresyl-PEG. Tresyl-PEG kobler seg via aminogruupper og danner et stabilt sekun-

30 dært amin. Sekundære aminer har den fordel at de bevarer den positive ladning av aminogruppen. Tresyl-PEG-reagensmiddel er handelstilgjengelig og er stabilt som et lyofilisert og tørket pulver. Tresyl-PEG er blitt grundig kjennetegnet, og reaksjonen og biproduktene er godt forstått. Følgelig komplekseres i en foretrukket utførelse α -Gal A-preparatet ved bruk av tresylmonometoksy-PEG (TMPEG) for å danne

et PEGylert α -Gal A. Det PEGylerte α -Gal A renses deretter for å gi et islert, PEGylert α -Gal A.

SKJEMATIKK AV REAKSJONEN



α -Gal A inneholder 18 aminogrunder, nemlig 17 ϵ -aminogrunder (lysin) og én α -aminogruppe (N-terminus). Reaksjonen kan reguleres til å danne α -Gal A med minimale substitusjoner, og deretter kan molekyler med ett PEG pr. molekyl, eller et midlere gjennomsnittlig antall PEG pr. molekyl, renses fra de usubstituerte og multipelt substituerte former. Multiple substitusjoner på α -Gal A endrer kanskje ikke vesentlig den biologiske aktivitet, og derfor kan sluttproduktet bestå av en heterogen blanding av ett til 18 bundne PEG-molekyler. Substitusjonsgraden vil avhenge av nivået av bevart enzymatisk aktivitet. Det bør bemerkes at en nedsatt enzymatisk aktivitet kan gjøres opp av en forsterket terapeutisk virkning som skyldes en forlenget sirkulasjonshalveringstid og nedsatt immunogenkjennings av α -Gal A. Dermed bør forholdet av PEG og α -Gal A under utvikling av et PEG- α -Gal A-produkt avhenge av den biologiske aktivitet, og ikke utelukkende av den enzymatiske aktivitet.

PEGyleringsreaksjonen krever en regulert pH, buffersammensetning og proteinkonsentrasjon. Riktige reaksjonsbetingelser kan oppnås ved hjelp av et ultrafiltrasjons/diafiltrasjonsstrinn, som brukes idag under fremstillingen. Umiddelbart før reaksjonen, løseliggjøres tresyl-PEG raskt i vann under kontinuerlig omrøring. Denne oppløsning tilsettes deretter til det fremstilte α -Gal A og får reagere over et regulert tidsrom og ved en regulert temperatur (f.eks. 2 timer ved 250°C). PEGylering kan finne sted før den endelige renseprosess, hvilket vil gjøre det unødvendig å føye flere trinn til renseprosessen. Etter at koblingen er fullført, prosesseres PEG- α -Gal A ved de gjenværende trinn av renseprosessen. Å utføre reaksjonen før Q-kolonne (anionbytte) gjør det mulig med to rensetrinn for å fjerne reaksjonsbiproduktene. Fordi PEG ikke inneholder noen negativ ladning, vil det ikke holdes fast av Q-"Sephacrose", og vil elueres i det tomme volum.

Graden av PEGylering kan måles ved kjente teknikker. F.eks. fluorescerer fluorescamin når det bindes til α -amino- og ϵ -aminogrunder av proteiner. Prosentdelen tapt fluorescens etter PEGyleringen korrelerer med prosentdelen PEG som er bundet til

α -Gal A. Pierce's BCA-assay for samlet protein kan brukes for å bestemme protein-konsentrasjonen. Metylumbelliferyl- α -D-galaktopyranosid (4-MUF- α -Gal)-aktivitets-assayet brukes for å bedømme virkningen på PEG- α -Gal A-enzymatisk aktivitet. α -Gal A inneholder M6P, som er nødvendig for opptaket i lysosomer. Hvis PEG forstyrrer M6P-reseptorgjenkjenningen, kan dette påvises ved bruk av et cellebasert assay for å overvåke det cellulære opptak av PEG- α -Gal A i lysosomer.

Fremgangsmåter ved administrasjon av α -Gal A-preparater

De aktuelle fremstilte sammensetninger (dvs. omfattende forskjellige α -Gal A-glykoformer) kan administreres ved oral rute. Det rensede α -Gal A-preparat kan administreres til individer som daner utilstrekkelig eller defekt α -Gal A-protein, eller som kan ha nytte av en α -Gal A-terapi.

Mengden av protein som skal leveres, kan bestemmes ved faktorer som det ligger innen den behandelende leges skjønn å kunne bedømme. Videre er fagmannen kjent med at doseringen av et terapeutisk protein kan varieres for en gitt pasient inntil det oppnås et terapeutisk doseringsnivå.

Farmasøytisk formulering av α -Gal A-protein

De aktuelle orale formuleringer som benyttes av et α -Gal A-preparat er i det vesentlige er frie for ikke- α -Gal A-proteiner, såsom albumin, ikke- α -Gal A-proteiner produsert i vertcellen eller proteiner isolert fra dyrevev eller -væske.

For lyofilisering av α -Gal A-preparater, kan proteinkonsentrasjonen være 0,1-10 mg/ml. Bulkstoffer, såsom glycin, mannitol, albumin og dekstran, kan tilsettes til lyofiliseringsblandingen. I tillegg kan mulige kryobeskyttelsesmidler, såsom disakkarider, aminosyrer og PEG, tilsettes til lyofiliseringsblandingen. Hvilke som helst av de ovennevnte buffere, ekspiensere og rensemidler kan også tilsettes.

De følgende eksempler presenteres for å illustrere de foretrukne utførelser av oppfinnelsen i større detalj.

Eksempel 1 Fremstilling og bruk av konstrukter utformet for å levere og uttrykke α -Gal A

To ekspresjonsplasmider, pXAG-16 og pXAG-28, ble konstruert. Disse plasmider inneholder humant α -Gal A-cDNA som koder for de 398 aminosyrer av α -Gal A-enzym (uten α -Gal A-signalpeptid); humant veksthormon (hGH)-signalpeptid-genomisk DNA-sekvens, som avbrytes av det første intron av hGH-gen; og 3'-utranslatert sekvens (UTS) av hGH-gen, som inneholder et signal for polyadenylasjon. Plasmid-pXAG-16 har human cytomegalovirus-umiddelbar-tidlig (CMV IE)-promoter og første intron (flankert av ikke-kodende ekson-sekvenser), mens pXAG-28 drives av kollagen I α 2-promoter og ekson 1, og også inneholder β -aktin-genets 5'-UTS, som inneholder det første intron av β -aktin-gen.

1.1 Kloning av den fullstendige α -Gal A-cDNA, og konstruksjon av α -Gal A-ekspresjonsplasmidet pXAG-16

Humant α -Gal A-cDNA ble klonet fra en human fibroblast-cDNA-samling som ble konstruert som følger. Poly-A⁺-mRNA ble isolert fra det samlede RNA, og cDNA-syntese ble utført ved bruk av reagensmidler for lambda-"ZapII"-systemet i henhold til produsentens anvisninger (Stratagene Inc., LaJolla, CA). Først ble "første kjede"-cDNA generert ved revers transkripsjon i nærvær av en oligo-dT-primer som inneholdt en intern XhoI-restriksjonsendonukleasestilling. Etter behandling med RNase H, ble cDNA "nick"-translatert med DNA-polymerase I for å generere dobbeltkjedet cDNA. Dette cDNA ble buttgjort med T4-DNA-polymerase og ligert til EcoRI-adaptorer. Produktene av denne limering ble behandlet med T4-DNA-kinase og spaltet med XhoI. cDNA'et ble frasjonert ved "Sephacryl"-400-kromatografi. Store og middels store fraksjoner ble samlet, og cDNA'ene ble ligert med EcoRI- og XhoI-spaltede Lambda ZapII-arme. Produktene av denne limering ble deretter forpakket og titrert. Den primære samling hadde en titer på $1,2 \times 10^7$ pfu/ml og en midlere innføyingsstørrelse på 925 bp.

En 210 bp probe fra ekson 7 av humant α -Gal A-gen (fig. 1, SEKV. ID NR: 1) ble brukt for å isolere cDNA. Proben ble i og for seg isolert fra genomisk DNA ved polymerasekjedereaksjon (PCR) ved bruk av de følgende oligonukleotider: 5'-CTGGGCTGTAGCTATGATAAAC-3' (Oligo 1; SEKV. ID NR: 6) og 5'-TCTAGCTGAAGCAAACAGTG-3' (Oligo 2; SEKV. ID NR: 7). PCR-produktet ble deretter brukt for å teste fibroblast-cDNA-samlingen, og positive kloner ble isolert og karakterisert nærmere. Én positiv klon, fag 3A, ble underkastet utskjæ-

ringsprotokollen med lambda "ZapII"-systemet (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) i henhold til produsentens anvisninger. Denne prosedyre gav plasmid pBSAG3A, som inneholder α -Gal A-cDNA-sekvensen i "pBluescriptSK"-plasmid-grunnstrukturen. DNA-sekvensiering viste at dette plasmid ikke inneholdt den fullstendige 5'-ende av cDNA-sekvensen. Derfor ble 5'-ende rekonstruert ved bruk av et PCR-fragment som var amplifisert fra humant genomisk DNA. For å oppnå dette ble et 268 bp genomisk DNA-fragment (fig. 2, SEKV. ID NR: 2) amplifisert ved bruk av de følgende oligonukleotider: 5'-ATTGGTCCGCCCTGAGGT-3' (Oligo 3; SEKV. ID NR: 8) og 5'-TGATGCAGGAATCTGGCTCT-3' (Oligo 4; SEKV. ID NR: 9). Dette fragment ble delklonet inn i en "TA"-kloningsplasmid (Invitrogen Corp., San Diego, CA) for å generere plasmidet pTAAGEI. Plasmidet pBSAG3A, som inneholder hovedparten av α -Gal A-cDNA-sekvensen, og pTAAGEI, som inneholder 5'-ende av α -Gal A-cDNA, ble begge spaltet med SacII og NcoI. Posisjonene av de relevante SacII- og NcoI-seter i det amplifiserte DNA-fragment vises på fig. 2. Det 0,2 kb lange SacII-NcoI-fragment fra pTAAGEI ble isolert og ligert med pBSAG3A som var blitt spaltet på same måte. Dette plasmid, pAGAL, inneholder den fullstendige α -Gal A-cDNA-sekvens, også omfattende sekvensen som koder for α -Gal A-signalpeptidet. cDNA'et ble sekvensiert fullstendig (vist på fig. 3, omfattende α -Gal A-signalpeptidet; SEKV. ID NR: 3) og viste seg å være identisk med den publiserte sekvens for humant α -Gal A-cDNA (Genbank-sekvens HUMGALA).

Plasmidet pXAG-16 ble konstruert via flere mellomprodukter, som følger. Først ble pAGAL spaltet med SacII og XhoI, og endene ble gjort butte. Derne ble endene av det fullstendige α -Gal A-cDNA ligert md XbaI-bindeledd og delklonet inn i XbaI-spaltet pEF-BOS (Mizushima *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18: 5322, 1990), hvilket gav pXAG-1. Dette konstrukt inneholder human granulocyt-kolonistimulerende faktor (G-CSF)-3'-UTS og human forlengelsesfaktor 1a (EF-1a)-promoter som flankerer cDNA som koder for α -Gal A plus α -Gal A-signalpeptidet, slik at 5'-ende av α -Gal A-cDNA er kondensert med EF-1a-promoter. For å danne et konstrukt med CMV-IE-promoter og første intron, ble α -Gal A-cDNA og G-CSF-3'-UTS fjernet fra pXAG-1 som et 2 kb langt XbaI-BamHI-fragment. Fragmentets ender ble gjort butte, ligert med BamHI-bindeledd og innføydd i BamHI-spaltet pCMVflpNeo (som ble konstruert slik det skal beskrives i det følgende). Orienteringen var slik at 5'-ende av α -Gal A-cDNA ble sammensmeltet med CMV-IE-promoterområde.

pCMVflpNeo ble fremstilt som følger. Et CMV-IE-genpromoterfragment ble amplifisert ved PCR ved bruk av CMV-genomisk DNA som sjablone og oligonukleotidene: 5'-TTTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGACTAG-3' (SEKV. ID NR: 10) og 5'-

TTTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC-3' (SEKV. ID NR: 11). Det dannede produkt (et 1,6 kb langt fragment) ble spaltet med BamHI, hvilket gav et CMV-promoterholdig fragment med kohesive BamHI-spaltede ender. neo-ekspresjonsenheden ble isolert fra plasmidet pMC1neopA (Stratagene Inc., La Jolla, CA) som et 1,1 kb XhoI-BamHI-fragment. Det CMV-promoterholdige fragment og neo-fragmentet ble innfyd i et BamHI-, XhoI-spaltet plasmid (pUC12). Spesielt inneholder pCMVflpNeo CMV-IE-promoteromrade, startende ved nukleotid 546 og sluttende ved nukleotid 2105 (av Genbank-sekvensen HS5MIEP), og neomycin-resistensgen drevet av herpes simplex-virus (HSV)-tymidinkinase-promoter (TKneo-gen) umiddelbart i 5'-retning for CMV-IE-promoterfragment. Transkripsjonsretningen av neo-genet er det samme som for CMV-promoterfragment. Dette mellomkonstrukt ble kalt pXAG-4.

For a tilsette hGH-3'-UTS, ble GCSF-3'-UTS fjernet fra pXAG-4 som et XbaI-SmaI-fragment, og endene av pXAG-4 ble gjort butte. hGH-3'-UTS ble fjernet fra pXGH5 (Selden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6: 3173-3179, 1986) som et 0,6 kb SmaI-EcoRI-fragment. Etter at endene av dette fragment var blitt gjort butte, ble det liert inn i pXAG-4 umiddelbart etter det butt-endede XbaI-sete av pXAG-4. Dette mellomprodukt ble benevnt pXAG-7. TKneo-fragmentet ble fjernet fra denne plasmid som et HindIII-ClaI-fragment, og endene av plasmidet ble gjort butte ved "innfylling" med Klenow-fragment av DNA-polymerase I. Et neomycin-resistensgen drevet av SV40-tidlig promoter ble ligert inn som et buttgjort ClaI-BsmBI-fragment fra et spaltlingsprodukt av pcDNeo (Chen *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745-2752, 1987), hvilket plasserte neo-transkripsjonsenheden i samme orientering som α -Gal A-transkripsjonsenheden. Dette mellomprodukt ble benevnt pXAG-13.

For a fullfore pXAG-16, som har den 26 aminosyrer lange hGH-signalpeptidkodende sekvens og første intron av hGH-gen, ble først et 2,0 kb EcoRI-BamHI-fragment fra pXAG-13 fjernet. Dette fragment omfattet α -Gal A-cDNA og hGH-3'-UTS. Dette store fragment ble erstattet med 3 fragmenter. Det første fragment bestod av et 0,3 kb PCR-produkt av pXGH5, som inneholder hGH-signalpeptidkodende sekvens og omfatter hGH-første intron-sekvens, fra et syntetisk BamHI-sete plassert rett oppstroms for Kozak-konsenssekvensen mot enden av hGH-signalpeptidkodende sekvens. De fylgende oligonukleotider ble brukt for a amplifisere dette fragment (fragment 1): 5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3' (Oligo HGH101; SEKV. ID NR: 12) og 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTCTTGAA-3' (Oligo HGH102; SEKV. ID NR: 13). Det andre fragment bestod av et 0,27 kb PCR-produkt som inneholdt sekvenser som tilsvarte starten av cDNA som kodet for det 398 aminosyrer lange α -Gal A-enzym (dvs. som manglet α -Gal A-signalpeptidet) til NhaI-sete. De fylgen-

de oligonukleotider ble brukt for å amplifisere dette fragment (fragment 2): 5'-TTTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3' (Oligo AG10; SEKV. ID NR: 14) og 5'-TTTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3' (Oligo AG11; SEKV. ID NR: 15). Det tredje fragment bestod av NheI-EcoRI-fragment av pXAG-7 som inneholdt resten av α -Gal A-sekvensen samt hGH-3'-UTS (fragment 3).

Fragment 1 (spaltet med BamHI og NaeI), fragment 2 (spaltet med PvuII og NheI) og fragment 3 ble blandet med det 6,5 kb lange BamHI-EcoRI-fragment av pXAG-13 som inneholdt neo-gen og CMV-IE-promoter, og ligert sammen for å generere plasmidet pXAG-16 (fig. 4).

1.2 Konstruksjon av α -Gal A-ekspresjonsplasmidet pXAG-28

Human kollagen-I α 2-promoter ble isolert for bruk i α -Gal A-ekspresjonskonstruktet pXAG-28 som følger. Et 408 bp langt PCR-fragment av humant genomisk DNA som inneholdt deler av human kollagen-I α 2-promoter, ble isolert ved bruk av de følgende oligonukleotider:

5'-TTTTGGATCCGTGTCCCATAGTGTTCCTCAA-3' (Oligo 72; SEKV. ID NR: 16) og 5'-TTTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3' (Oligo 73; SEKV. ID NR: 17).

20 Dette fragment ble brukt til å teste en human leukocyttssamling i EMBL3 (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Én positiv klon (fag 7H) som inneholdt et 3,8 kb EcoRI-fragment, ble isolert og klonet inn i pBSIISK⁺ (Stratagene Inc., La Jolla, CA) i EcoRI-sete (under spaltning av pBS/7H.2). Et AvrII-sete ble innført i pBSIISK⁺ ved å spalte med SpeI, som spalter innen pBSIISK⁺-polybindeleddet, "innfylling" med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I og innføre oligonukleotidet 5'-CTAGTCCTAGGA-3' (SEKV. ID NR: 18). Denne variant av pBSIISK⁺ ble spaltet med BamHI og AvrII og ligert til det 121 bp lange BamHI-AvrII-fragment av det opprinnelig 408 bp lange kollagen-I α 2-promoter-PCR-fragment som ble beskrevet ovenfor, hvilket gav pBS/121COL.6.

30 Plasmidet pBS/121COL.6 ble spaltet med XbaI, som spalter innen pBSIISK⁺-polybindeleddssekvensen, "innfylt" med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I og spaltet med AvrII. Det 3,8 kb lange BamHI-AvrII-fragment av pBS/7H.2 ble isolert, og BamHI-setets ender ble buttgjort ved behandling med Klenow-enzym. Fragmentet ble deretter spaltet med AvrII og ligert til AvrII-spaltet vektor, hvilket gav kollagen-promoterplasmid pBS/121bpCOL7H.18.

Deretter ble kollagen-promoteren kombinert med 5'-UTS av humant β -aktin-gen, som inneholder det første intron av humant β -aktin-gen. For å isolere denne sekvens ble et 2 kb langt PCR-fragment isolert fra humant genomisk DNA ved bruk av de følgende oligonukleotider:

- 5 5'-TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3' (Oligo BA1; SEKV. ID NR: 19) og
5'-TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC-3' (Oligo BA2; SEKV. ID NR: 20).

Dette fragment ble spaltet med BamHI og BsiHKAI for å frigi et 0,8 kb fragment som inneholdt β -aktin-5'-UTS og intron. Et 3,6 kb SalI-SrfI-fragment ble deretter isolert fra kollagenpromoterplasmidet pBS/121bpCOL7H.18 som følger.

- 10 pBS/121bpCOL7H.18 ble delvis spaltet med BamHI (BamHI-setet ligger i 5'-ende av av kollagen- $\text{I}\alpha 2$ -promoterfragment), endene ble gjort butte ved behandling med Klenow-fragmentet, og det hele ble ligert til et SalI-bindeledd (5'-GGTCGACC-3'), hvorved man plasserte et SalI-sete oppstrøms for kollagen- $\text{I}\alpha 2$ -promoter. Dette plasmid ble deretter spaltet med SalI og SrfI (SrfI-setet ligger 110 bp oppstrøms
15 for kollagen- $\text{I}\alpha 2$ -promoter-CAP-sete), og det 3,6 kb lange fragment ble isolert. Det 0,8 hhv. 3,6 kb lange fragment ble slått sammen med SalI- og BamHI-spaltet pBSIISK⁻ (Stratagene Inc., La Jolla, CA), og et fragment bestående av de følgende fire oligonukleotider ble ligert (hvorved det dannes et fragment med en butt ende og en BsiHKAI-ende):

- 20 5'-GGGCCCCAGCCCCAGCCCTCCATTGGTGGAGGCCCTTTTGGAGGCACCCTAGGG-
CCAGGAAACTTTTGCCGTAT-3' (Oligo COL-1; SEKV. ID NR: 21),
5'-AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTAGCACCACGGCCCGGAGACCGCGT-
CCGCCCCGCGAGCA-3' (Oligo COL-2; SEKV. ID NR: 22),
5'-TGCCCTATTTATACGGCAAAGTTTCCTGGCCCTAGGGTGCCTCCAAAAGGGCCT-
25 CCACCAATGGGAGGGCTGGGGCTGGGGGCC-3' (Oligo COL-3; SEKV. ID NR:
23) og
5'-CGCGGGGCGGACGCGGTCTCGGCGGCCGTGGTGCTAAAATAATAAGCCCGGATC-3'
(Oligo COL-4; SEKV. ID NR: 24).

- Disse fire oligonukleotider tilsvarer, når de er ligert, området startende ved SrfI-
30 sete av kollagenpromoter og fortsettende forbi BsiHKAI-sete av β -aktinpromoter. Det dannede plasmid ble benevnt pCOL/ β -aktin.

For å fullføre konstruksjonen av pXAG-28 ble SalI-BamHI-fragmentet av pCOL/ β -aktin, som inneholdt kollagen- $\text{I}\alpha 2$ -promoter og β -aktin-5'-UTS, isolert. Dette frag-

ment ble ligert med to fragmenter fra pXAG-16 (se eksempel 1.1 og fig. 4): (1) det 6,0 kb lange BamHI-fragment (inneholdende neo-genet, plasmidgrunnstrukturen, cDNA som kodet for den 398 lange aminosyre α -Gal A-enzym, og hGH-3'-UTS); og (2) 0,3 kb BamHI-XhoI-fragment (som inneholder SV40-poly-A-sekvensen fra pcDneo). pXAG-28 inneholder human kollagen-I α 2-promoter kondensert til humant β -aktin-5'-UTS, hGH-signalpeptidet (som avbrytes av hGH-første intron), cDNA som koder for α -Gal A-enzym, og hGH-3'-UTS. Et kart over det fullstendige ekspressjonskonstrukt pXAG-28 vises på fig. 5.

1.3 Transfeksjon og seleksjon av fibroblaster som er blitt elektroporert med α -Gal A-ekspressjonsplasmider

For å uttrykke α -Gal A i fibroblaster, ble sekundære fibroblaster dyrket og transfisert i henhold til publiserte prosedyrer (Selden *et al.*, WO 93/09222).

Plasmidene pXAG-13, pXAG-16 og pXAG-28 ble transfisert ved elektroporasjon i humane forhud-fibroblaster for å generere stabilt transfiserte klonale celledammer, og de resulterende α -Gal A-ekspressjonsnivåer ble overvåket som beskrevet i eksempel 1.4. Utsondringen av α -Gal A fra normale forhud-fibroblaster er i området 2-10 enheter/ 10^6 celler/24 timer. Derimot oppviste de transfiserte fibroblaster de midlere ekspressjonsnivåer som oppgis i tabell 2.

Tabell 2

Midlere α -Gal A-ekspressjonsnivåer (\pm standardavvik)

pXAG-13	420 \pm 344 U/ 10^6 celler/dag N=26 klonale stammer (område 3-1133 U/ 10^6 celler/dag)
pXAG-16	2,051 \pm 1253 U/ 10^6 celler/dag N=24 klonale stammer (område 422-5200 U/ 10^6 celler/dag)
pXAG-28	141 \pm 131 U/ 10^6 celler/dag N=38 klonale stammer (område 20-616 U/ 10^6 celler/dag)

Denne data viser at alle tre ekspressjonskonstrukter har evnen å øke α -Gal A-ekspressjonen til det mangfoldige sammenlignet med ikke-transfiserte fibroblaster. Ekspressjonen i fibroblaster som var blitt stabilt transfisert med pXAG-13, som koder for α -Gal A bundet til α -Gal A-signalpeptidet, var vesentlig lavere enn ekspressjonen i fibroblaster som var blitt transfisert med pXAG-16, som kun skiller seg i at signal-

peptidet er hGH-signalpeptidet, hvis kodende sekvens avbrytes av det første intron av hGH-gen.

Hver gang de transfiserte celler ble passert, ble den utsondrede α -Gal A-aktivitet bestemt, cellene ble telt, og celletettheten ble beregnet. På grunnlag av antallet
 5 celler som ble samlet, og tiden som sto til rådighet for utsondring av α -Gal A, ble den spesifikke ekspresjonsrate av α -Gal A bestemt, og oppgis i tabellene 3 og 4 som utsondrede enheter (av α -Gal A) pr. 10^6 celler pr. 24 timer. Cellestammer som var ønskelige for genterapi eller for bruk ved generering av materiale for isolasjon av α -Gal A, bør oppvise en stabil vekst og ekspresjon over flere passasjer. Data fra
 10 cellestammene som vises i tabellene 3 og 4, som var stabilt transfisert med α -Gal A-ekspresjonskonstruktet pXAG-16, illustrerer det faktum at α -Gal A-ekspresjonen holdes stabil under seriell passasje.

Tabell 3

Vekst og ekspresjon av BRS-11-celler som inneholdt
 15 α -Gal A-ekspresjonskonstruktet pXAG-16

Passasje	Ekspresjon (enheter/ 10^6 celler/24 timer)	Celletetthet (celler/cm ²)
13	2601	$4,80 \times 10^4$
14	1616	$4,40 \times 10^4$
15	3595	$4,40 \times 10^4$

Tabell 4

Vekst og ekspresjon av HF505-242-celler som inneholdt
 20 α -Gal A-ekspresjonskonstruktet pXAG-16

Passasje	Ekspresjon (enheter/ 10^6 celler/24 timer)	Celletetthet (celler/cm ²)
5	4069	$2,80 \times 10^4$
6	7585	$3,55 \times 10^4$
7	5034	$2,48 \times 10^4$

1.4 Kvantifisering av α -Gal A-ekspresjonen

Akiviteten av α -Gal A-aktiviteten ble målt ved bruk av det vannløselige substrat 4-metylumbelliferyl- α -D-galaktopyranosid (4-MUF-gal; Research Products, Inc.) ved en modifikasjon av protokollen som beskrives av Ioannou *et al.*, *J. Cell Biol.* 119: 1137-1150 (1992). Substratet ble løst opp i substratbuffer (0,1 M citrat/fosfat, pH 4,6) til en konsentrasjon på 1,69 mg/ml (5 mM). Typisk ble 10 ml kultur-supernatant tilsatt til 75 ml av substratopløsningen. Rørene ble dekket til og fikk inkubere i et 37°C vannbad i 60 minutter. I slutten av inkubasjonsperioden ble 2 ml glycin/karbonat-buffer (130 mM glycin, 83 mM natriumkarbonat, pH 10,6) brukt for å stanse reaksjonen. Den relative fluorescens av hver prøve ble målt ved bruk av et fluorometer, modell TK0100 (Hoefer Scientific Instrument), som har en fast eksitasjonsbølglengde på 365 nm og påviser en fast emisjonsbølglengde på 460 nm. Avlesningene fra prøvene ble sammenlignet med standarder fremstilt fra en 1 mM stamopløsning av metylumbelliferon (Sigma Chemical Co.), og mengden av hydrolysert substrat ble beregnet. Aktiviteten av α -Gal A uttrykkes i enheter; én enhet α -Gal A-aktivitet er likeverdig med én nanomol substrat hydrolysert pr. time ved 37°C. Celleekspresjonsdataen ble generelt uttrykt som enheter α -Gal A-aktivitet utsondret/ 10^6 celler/24 timer. Dette assay ble også brukt til å måle mengden α -Gal A-aktivitet i cellelysater og i prøver fra forskjellige α -Gal A-rensetrinn, slik det skal beskrives i det følgende.

1.5 Fremstilling av gen-aktivert α -Gal A (GA-GAL)

Produksjon av gen-aktivert α -Gal A (GA-GAL) fant sted ved innføring av regulatoriske og strukturelle DNA-sekvenser oppstrøms for human α -Gal A-kodende sekvens, ved bruk av GA-teknologi i det vesentlige som beskrevet i US-patent 5.733.761. Den nøyaktige innføring av den genaktiverende sekvens finner sted som et resultat av en homolog rekombinasjon mellom DNA som foreligger på et transisert DNA-fragment, og genomiske DNA-sekvenser oppstrøms for α -Gal A-lokus i en human celle. Den genaktiverende sekvens i og for seg inneholder α -Gal A-kodende sekvens opptil, men ikke inklusive signalpeptid-spaltningssitet. Celler som inneholder et aktivert α -Gal A-lokus, ble isolert og underkastet legemiddelseleksjon for å isolere celler med hevet GA-GAL-produksjon.

Et målrettende DNA-fragment som inneholdt en egnet genaktiverende sekvens, ble innført i humane vertcellerlinjer ved elektroporasjon. Én slik cellelinje er HT-1080, en sertifisert cellelinje som er tilgjengelig fra ATCC (Rockville, Maryland). Genakti-

veringsplasmidet (målrettingskonstruktet) pGA213C som inneholder et slikt DNA-fragment, vises på fig. 9. Dette plasmid inneholder sekvenser som er utviklet til å aktivere en del av den endogene α -Gal A-lokus i vertselletlinjen, og inneholder sekvenser som koder for signalpeptidet, men ikke humant α -Gal A. Målrettingskonstruktet inneholder også ekspresjonskassetter for bakterielt *neo*- og muse-*dhfr*-gen. Disse muliggjør en seleksjon av stabilt integrerte målrettingsfragmenter (via *neo*-genet) og en påfølgende seleksjon av *dhfr*-genet ved bruk av trinnvis metotreksat (MTX)-seleksjon.

I tillegg inneholder pGA213C sekvenser utviklet for å målrette kromosomale sekvenser oppstrøms for endogen α -Gal A-lokus ved homolog rekombinasjon. Homolog rekombinasjon mellom endogen α -Gal A-lokus og det 9,6 kb lange DNA-fragment av pGA213C vises på fig. 10.

pGA213C ble konstruert for å slette 962 bp av genomiske sekvenser som strakk seg fra posisjonene -1183 til -222 i forhold til metionin-initieringskodonet av α -Gal A, etter homolog rekombinasjon av pGA213C-fragmentet med X-kromosomal α -Gal A-lokus. Transkripsjonell aktivering av α -Gal A-lokus finner sted ved nøyaktig målretting av de eksogene regulatoriske sekvenser oppstrøms for α -Gal A-kodende parti. Den dannede GA-GAL-lokus gjør at transkripsjonen initieres fra CMV-promoter og fortsetter forbi CMV-ekson 1, aldolase-intron og de syv eksoner og seks introner av α -Gal A-kodende sekvens. Skjøting av det store forløper-mRNA føyer sammen eksogent CMV-ekson (innføyd ved målretting) med det fullstendige endogene første ekson av α -Gal A-transkriptet. En translasjon av GA-GAL-mRNA fører til pre-GA-GAL med et 31 aminosyrers signalpeptid. Etter utsondring fra vertscellen, fjernes signalpeptidet. Riktig målrettede cellelinjer identifiseres først ved polymerasekjedereaksjonstesting for nærvær av GA-GAL-mRNA. Kloner som produserer GA-GAL-mRNA, viser seg også å utsondre enzymatisk aktivt α -Gal A i kulturmediet. En senere bekreftelse av målrettingshendelsene utføres ved restriksjonsenzym-spaltning og "southern blot"-hybridiseringsanalyse av genomisk DNA.

Cellene ble underkastet et trinnvis utvalg med metotreksat ("MTX"). Etter utvalg i 0,05 μ M MTX, ble en klon av celler isolert og underkastet 0,1 μ M MTX-utvalg. Fra denne prosess isolerte man en samling av celler som var resistente mot 0,1 μ M MTX (cellelinje RAG001), ekspanderte den i kultur og karakteriserte den.

Eksempel 2 α -Gal A-rensing

Det følgende er en foretrukken metode for å produsere, rense og teste α -Gal A. Renseprosessen beholder α -Gal A i løselig, aktiv, nativ form gjennom hele renseprosessen. Proteinet utsettes ikke for ekstrem pH, organiske løsemidler eller rensemidler, spaltes ikke proteolytisk under renseprosessen, og danner ikke aggregater. Renseprosessen er utviklet til å ikke endre fordelingen av α -Gal A-glykoformer.

2.1 Rensing av α -Gal A

Eksempel 2.1 illustrerer at α -Gal A kan renses til nær homogenisitet fra det kondisjonerte medium av dyrkede humane cellestammer som er blitt stabilt transifisert til å produsere enzymet. α -Gal A isoleres fra α -Gal A-holdig medium ved bruk av en rekke på fem kromatografiske trinn. De fem trinn benytter seg av forskjellige separasjonsprinsipper som drar fordel av forskjellige fysiske egenskaper av enzymet, for å separere α -Gal A fra forurensende materiale. Omfattet er hydrofob vekselvirkningskromatografi på butyl-"Sephacrose", ionisk vekselvirkning på hydrokxyapatitt, anionbyttekromatografi på Q-"Sephacrose" og størrelseseksklusjonskromatografi på "Superdex" 200. I tillegg til å være det endelige trinn i renseprosessen, tjener størrelseseksklusjonskromatografi også som en virksom måte å overføre det rensede protein til en formuleringskompatibel buffer.

A. *Anvendelse av butyl-"Sephacrose"-kromatografi som et første trinn ved rensing av α -Gal A*

Kaldt kondisjonert medium (1,34 l) ble klarnet ved sentrifugering og filtrert gjennom et 0,45 μ m celluloseacetatfilter ved bruk av glassfiber-forfiltre. Under omrøringen ble pH av det kalde, filtrerte medium justert til 5,6 ved en dråpevis tilsetning av 1 N HCl, og ammoniumsulfat ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,66 M ved en dråpevis tilsetning av en stamopløsning (romtemperatur) av 3,9 M ultrarent ammoniumsulfat. Mediet ble omrørt i ytterligere 5 minutter ved 4°C, filtrert som beskrevet ovenfor og påført på en butyl-"Sephacrose"-kolonne med en 14 kolonnevolumers lineær gradient fra buffer A (inneholdende ammoniumsulfat) til 10 mM MES-Tris, pH 5,6 (intet ammoniumsulfat). Fraksjonene ble testet for α -Gal A-aktivitet ved 4-MUF-gal-assayet, og fraksjonene som inneholdt en målbar enzymaktivitet, ble samlet. Slik det fremgår fra fig. 8 og renseoppsummeringen (tabell 5), fjerner dette trinn ca. 99% av de forurensende proteiner (pre-kolonneprøve = 8,14 g samlet protein; post-kolonneprøve = 0,0638 g samlet protein).

Tabell 5
Rensing av α -Gal A fra det kondisjonerte medium av
stabilt transfiserte humane fibroblaster

Rensetrinn	Volum (ml)	α -Gal A-aktivitet ($\times 10^6$ enheter)	Samlet protein (mg)	Spesifikk aktivitet ($\times 10^6$ enheter/mg)	Foldingsrensing (kumulativ)	Prosent isolasjon
Kultursupernatant	1340	14,6	8140	0,0018	=1	=100
Butyl "Sephарose"	417	14,1	63,8	0,221	123	96,6
Heparin-"Sephарose"	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Hydroksyapatitt	47	9,73	4,46	2,18	1220	66,6
Q-"Sephарose"	31,5	8,91	3,31	2,69	1503	61,0
"Superdex"	10	8,58	2,93	2,92	1634	59,0

5 B. *Anvendelse av Heparin-"Sephарose"-kromatografi som trinn for rensing av α -Gal A*

Butyl-"Sephарose"-kolonneoppfraksjonene ble dialysert ved 4°C mot (4 l) 10 mM MES-Tris, pH 5,6 (ladet én gang). Ledeevnen av dialysatet ble justert til 1,0 mMH₀ ved 4°C ved tilsetning av H₂O eller NaCl etter behov. Deretter ble prøven påført på

10 en kolonne av Heparin-"Sephарose" 6 Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 29 ml kolonnevolum, 2,5 \times 6 cm) som var blitt ekvilibrert i 10 mM MES-Tris, pH 5,6, som inneholdt 9 mM NaCl (buffer B). Dette ble utført ved 4°C ved en strømningsrate på 10 ml/min. Inline-UV (280 nm) og ledenevne-overvåkningsanordninger målte den samlede protein- og saltkonsentrasjon. Etter at prøven var blitt påført, ble kolonnen vasket med 10 kolonnevolumer buffer B fulgt av 3 kolonnevolumer med en

15 lineær gradient til 8% buffer C/92% buffer B (hvor buffer C er 10 mM MES-Tris, pH 5,6 som inneholder 250 mM NaCl) og vasking med 10 kolonnevolumer av 8% buffer C. Dette ble fulgt av eluering av α -Gal A med 1,5 kolonnevolumer av en lineær gradient til 29% buffer C og deretter 10 kolonnevolumer med en lineær gradient til

20 35% buffer C. Fraksjonene ble testet for sin α -Gal A-aktivitet, og de som inneholdt en målbar aktivitet, ble samlet.

C. *Bruk av hydroksyapatittkromatografi som trinn for rensing av α -Gal A*

Heparinsamlingen ble filtrert og påført direkte på en kolonne av Ceramic Hydroxyapatite HC (40 μ m; American International Chemical, Natick MA; 12 ml kolonnevolum, 1,5 x 6,8 cm) som var blitt ekvilibrert i 1 mM natriumfosfat, pH 6,0 (buffer D).
 5 Kromatografien ble utført ved romtemperatur på et hybrid "GradiFrac"/"FPLC"-system (Pharmacia, Uppsala, Sverige) utstyrt med inline-UV (280 nm) og ledeevneovervåkningsapparat. Etter at prøven var blitt påført (5 ml/min), ble kolonnen vasket med 10 kolonnevolumer buffer D. α -Gal A ble eluert med 7 kolonnevolumer lineær gradient til 42% buffer E/57% buffer D (hvor buffer E er 250 mM natriumfosfat, pH 6,0), fulgt av 10 kolonnevolumer med en gradient til 52% buffer E. Fraksjonene ble testet for sin α -Gal A-aktivitet, og fraksjonene som inneholdt en målbar aktivitet, ble samlet.

D. *Bruk av Q-"Sepharose"-anionbyttekromatografi som trinn for rensing av α -Gal A*

15 Hydroksyapatittsamlingen ble fortynnet ca, 1,5 ganger med H₂O til en endelig ledeevne på 3,4-3,6 mMHO ved romtemperatur. Etter filtrering ble prøven påført på en kolonne av Q-"Sepharose"-HP (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 5,1 ml kolonnevolum, 1,5 x 2,9 cm) ekvilibrert i 10% buffer G (90% buffer F, hvor buffer F er 25 mM natriumfosfat, pH 6,0, o buffer G er 25 mM natriumfosfat, pH 6,0, 250 mM NaCl).
 20 Kromatografien ble utført ved romteperatur på "Gradi-Frac"/"FPLC"-hybridsystemet (Pharmacia, Uppsala, Sverige), og de samlede protein- og saltkonsentrasjoner ble overvåket ved hjelp av inline-overvåkningsapparatene. Prøven ble påført med en strømningshastighet på 5 ml/min, og deretter ble de følgende trinn utført: (1) vasking med 5 kolonnevolumer 10% buffer G, (2) vasking med 7 kolonnevolumer 12%
 25 buffer G, (3) 3 kolonnevolumer med lineær gradient til 50% buffer G, (4) 10 kolonnevolumer med lineær gradient til 53% buffer G, (5) 3 kolonnevolumer med gradient til 100% buffer G, og (6) vasking med 10 kolonnevolumer 100% buffer G. α -Gal A'et ble primært eluert under trinn 3 og 4. Fraksjonene som inneholdt noen påvisbar aktivitet, ble samlet ("Q-samlingen").

30 E. *Anvendelse av "Superdex" 200-gelfiltrasjonskromatografi som trinn for rensing av α -Gal A*

Q-samlingen ble konsentrert omtrent 5 ganger ved bruk av "Centriprep" 10-sentrifugalkonsentratorenheter (Amicon, Beverly, MA) og påført på en kolonne med

"Superdex" 200 (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 189 ml kolonnevolum, 1,6 x 94 cm). Kolonnen ble ekvibrert og eluert med 25 mM natriumfosfat, pH 6,0, som inneholdt 150 mM NaCl. Kromatografien ble utført på et FPLC-system (Pharmacia, Uppsala, Sverige) ved romtemperatur ved bruk av en inline-UV-overvåkningsanordning (280 nm) for å følge med på elueringen av proteinet. Volumet av prøven som ble påført på kolonnen, var ≤ 2 ml, strømningshastigheten var 0,5 ml/min, og fraksjonsstørrelsen var 2 ml. Flere kolonnegjennomstrømninger ble utført; fraksjonene ble testet for α -Gal A-aktivitet, og fraksjonene som inneholdt en påvisbar aktivitet, ble samlet.

De samlede fraksjoner fra "Superdex" 200-kolonnen ble konsentrert ved bruk av "Centriprep" 100-enheter, alikvotert, sjokkfrosset og lagret ved -80°C over korte tidsrom. En oppsummering av dette eksempel på α -Gal A-rensing vises i tabell 5. Det endelige utbytte av α -Gal A var 59% av utgangsstoffets aktivitet, og den spesifikke aktivitet av det rensede produkt var $2,92 \times 10^6$ enheter/mg protein. Det dannede produkt oppviste et høyt nivå av renhet etter elektroforese under reduserende betingelser på 4-15% SDS-polyakrylamidgel, som deretter ble sølvfarget.

Sammenfatning

Renseprosessen tilveiebringer høyt rensed α -Gal A. Hovedparten av rensingen finner sted under de første 2 trinnene av rensesprosessen, mens de siste tre trinn tjener til å finpusse materialet ved å fjerne de gjenværende mindre forurensningene. Det siste trinn, nemlig størrelseseksklusjonskromatografi på "Superdex" 200, tjener også til å overføre α -Gal A'et til en formuleringskompatibel buffer.

2.2 Størrelse av α -Gal A som er blitt produsert av stabilt transfiserte humane celler i kultur

De strukturelle og funksjonelle egenskaper av rensed humant α -Gal A ble undersøkt. Det dannede produkt viste et høyt nivå av renhet etter elektroforese under reduserende betingelser på en 4-15% SDS-polyakrylamidgel, som deretter ble sølvfarget.

Den molekylære masse av α -Gal A ble bedømt ved MALDI-TOF-massespektrometri. Disse resultatene demonstrerer at molekylmassen av dimeren er 102.353 Da, mens molekylmassen av monomeren er 51.002 Da. Den forventede molekylmasse av

monomeren, basert på aminosyresammensetningen, er 45.400 Da. Derfor utgjør karbohydratinnholdet av enzymet opptil 5.600 Da av molekylvekten.

2.3 Karbohydratmodifikasjon av α -Gal A produsert av stabilt transfiserte humane celler

5 Glykosylasjonsmønstret av α -Gal A ble også bedømt. En riktig glykosylering er viktig for en optimal *in vivo*-aktivitet av α -Gal A; α -Gal A uttrykt i ikke-glykosylerende systemer er inaktivt eller ustabil. Hantzopolous *et al.*, *Gene* 57: 159 (1987). Glykosylering er også viktig for internaliseringen av α -Gal A i de ønskede målceller, og påvirker sirkulasjonshalveringstiden av enzymet *in vivo*. På hver delenheter av α -Gal
 10 A er det fire seter tilgjengelige for asparagin-bundne karbohydratkjeder, hvorav kun tre er tatt opp. Desnick *et al.*, i THE METABOLIC AND MOLECULAR BASES OF INHERITED DISEASE, McGraw Hill, New York, 1995), s. 2741-2780.

En prøve av α -Gal A som var blitt produsert av stabilt transfiserte celler, ble behandlet med neuraminidase, som isoleres fra *A. urafaciens* (Boehringer-Mannheim,
 15 Indianapolis, IN) for å fjerne sialsyren. Denne reaksjon ble utført ved å behandle 5 mg α -Gal A over natten med 10 mU neuraminidase ved romtemperatur i et endelig volum på 10 ml acetatbufret salin (ABS, 20 mM natriumacetat, pH 5,2, 150 mM NaCl).

Renset α -Gal A som var blitt produsert av stabilt transfiserte celler, ble også defosforylert ved bruk av alkalifosfatase (kalvetarm-alkalifosfatase, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), ved å behandle 5 mg α -Gal A over natten ved romtemperatur med 15 U alkalifosfatase i ABS (pH hevet til 7,5 med 1 M Tris).

Prøvene ble analysert ved SDS-PAGE og/eller isoelektrisk fokusering, fulgt av "western blotting" med et anti- α -Gal A-spesifikt antistoff. Antistoffet som ble brukt, var
 25 et polyklonalt kanin-anti-peptid-antistoff, som ble fremstilt ved bruk av et peptid som representerte aminosyrene 68-81 av α -Gal A som immunogen. Etter overføring av proteinet til PVDF (Millipore, Bedford, MA), ble membranen testet med en 1:2000 fortyning av antiserumet i 2,5% blotto (fettfri tørrmelk i 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,05% Tween-20). Dette ble fulgt av en påvisning med geite-anti-kanin-
 30 IgG konjugert med pepperrot-peroksidase (Organo Technique/Cappella, Durham, NC; 1:5000-fortynning) og reagensmidlene i ECL-kjemiluminescens-settet (Amersham, Arlington Heights, IN).

Behandling av α -Gal A med neuraminidase fulgt av SDS-PAGE-analyse førte til en endring av molekylmassen (ca. 1500-2000 Da eller 4-6 sialysyrer pr. monomer), hvilket tydet på at det forelå en omfattende modifikasjon av α -Gal A med sialysyre. Til sammenligning har plasmaformen for α -Gal A 5-6 sialysyreresiduer pr. monomer, og placentaformen har 0,5-1,0 sialysyreresiduer pr. monomer. Bishop *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 1307 (1981).

En annen metode som ble brukt til å undersøke sialysyren og M6P-modifikasjonene av α -Gal A, var isoelektrisk fokusering (IEF), hvor prøvene adskilles på grunnlag av sitt isoelektriske punkt (pI) eller nettoladningen. Dermed ville en fjerning av ladede residuer såsom sialysyre eller fosfat fra α -Gal A forventes å endre mobiliteten av proteinet i IEF-systemet.

For å utføre IEF-eksperimentet, ble prøver av α -Gal A som var blitt fremstilt i henhold til oppfinnelsen, behandlet med neuraminidase og/eller alkalifosfatase, blandet 1:1 med 2X Novex-prøvebuffer (med 8 M urea, pH 3,0-7,0) og ladet på en 6 M urea-IEF-gel (5,5% polyakrylamid) fremstilt ved bruk av "Pharmalyte" (Pharmacia, Uppsala, Sverige; pH 3,0-6,5; "Pharmalyte" 4-6,5 og 2,5-5,5; 0,25 ml av hver pr. gel). Standarder for det isoelektriske punkt (Bio-Rad) ble også innlemmet. Etter elektroforese ble gelen overført til PVDF, og en "western blot"-analyse ble utført som beskrevet ovenfor.

Neuraminidase-behandling av enzymet økte pI av alle tre isoformene, hvilket tydet på at alle var modifisert i noen grad med sialysyre. Denne data tyder på at α -Gal A-preparatene som er fremstilt slik det beskrives heri, bør ha en ønskelig plasmahalveringsid, hvilket tyder på at dette materiale er godt egnet for farmakologisk bruk. Videre hevet en behandling av neuraminidase-behandlet α -Gal A med alkalifosfatase pI-verdien av en del av proteinet ytterligere til ca. 5,0-5,1, hvilket tyder på at enzymet bærer ett eller flere M6P-residuer. Denne modifikasjon er nødvendig for en fremgangsrisk internalisering av α -Gal A i målcellene.

De N-bundne karbohydratkjeder av α -Gal A ble analysert ved ionbytte-HPLC (Glyco-Sep C) og merking av den ikke-reduserende ende med den fluorescerende forbindelse 2-aminobenzamid (AB). Resultatene av analysen av AB-glykaner fra tre forskjellige α -Gal A-preparater er sammenfattet i tabell 6. Alle tre preparater hadde et Z-tal over 170. Videre var 67% av glykanene sialylert, over 16% av glykanene var fosforylert og mindre enn 16% var nøytrale. Disse resultatene er meget gode sammenlignet med resultater som er blitt rapportert i teknikkens stand. F.eks. be-

skriver Desnick *et al.* (US-patent 5.356.804) at over 60% av glykanene var nøytrale, mens kun 11% var sialylert.

Tabell 6
Resultater av analysen av AB-glykaner fra GA-GAL

Behandling	Z-tall	% nøytrale	% mono-	% di-	% tri-	% tetra-
Ingen	170,04	16,83	22,8	39,45	15,34	5,58
Ingen	177,71	14,22	20,63	44,62	14,2	6,31
Ingen	171,68	15,81	20,73	43,2	14,33	5,39
Gjennomsnitt (N=3)	173,14	15,62	21,39	42,42	14,62	5,76
Neuraminidase	24,36	85,25	5,14	9,61	ND	ND
Alkalifosfatase	150,93	23,38	24,47	34,28	13,58	4,29

5

Prosentdel av totalen	GA-GAL-preparater ifølge foreliggende oppfinnelse	Desnick <i>et al.</i> , US-patent 5.356.804
P-glykaner totalt	16,62	24,1
Totalt sialylerte	67,57	11
Nøytrale totalt (hih-mannose og hybrid)	15,62	62,9

Ytterligere detaljerte trekk av de rensede GA-GAL-preparater oppgis i tabell 7.

Tabell 7
GA-GAL rensset bulk

Assay	40-173-KH	42-202-KH
Spesifikk aktivitet	4,75	2,80
SDS-PAGE Coomassie	100%	100%
SDS-PAGE sølvflekking	99,6%	100%
Reversfase-HPLC	100%	99,94
Størrelseseksklusjonskromatografi	0%	0,01%
Internalisering i forhud-fibroblaster	124,6%	94,3%

10

2.4 Økende andel av ladet α -Gal A ved fraksjonisering av α -Gal A-arter

Slik det ble beskrevet ovenfor, kan en fraksjonisering av α -Gal A-glykoformer utføres under forskjellige trinn av renseprosessen som beskrives heri. I foreliggende eksempel ble α -Gal A-glykoformene fraksjonisert i henhold til størrelse og ladning. Det er også mulig å fraksjonisere α -Gal A ved en kombinasjon av disse eller andre kromatografiske teknikker som beskrevet ovenfor.

For størrelsesfraksjonisering av α -Gal A-glykoformer ble størrelseseksklusjonskromatografi utført på en "Superdex" 200-kolonne (Pharmacia, 1,6 cm \times 94,1 cm) ekvilibret i fosfatbufret salin ved pH 6. α -Gal A (2,6 mg i 1 ml) ble påført på kolonnen, og kolonnen ble eluert ved 0,35 ml/min. Fraksjoner ble samlet over elueringsprofilen, og fraksjonene som omfattet den brede elueringstopp av α -Gal A, ble analysert ved SDS-PAGE og deretter visualisert ved sølvflekking. Fraksjonene av den førende kant av toppen inneholdt α -Gal A med den høyeste molekylvekt, og idet fraksjonene fortsatte over toppen, sank den tilsynelatende molekylvekt av α -Gal A'et gradvis. Fraksjoner av α -Gal A ble deretter valgt og samlet for å gi et α -Gal A-preparat i den ønskede molekylvektområde.

For fraksjonisering av α -Gal A-glykoformer i henhold til ladningen, ble α -Gal A fraksjonisert ved Q-"Sephacrose"-kromatografi. Q-"Sephacrose"-kolonnen (1,5 cm \times 9,4 cm) ble ekvilibret i 20 mM natriumfosfat, pH 6,0, som inneholdt 30 mM NaCl, og strømningshastigheten ble holdt på 5 ml/min. α -Gal A i (130 mg i 166 ml) ble påført på kolonnen, vasket med ekvibreringsbuffer og deretter eluert med 20 mM natriumfosfat, pH 6,0, som inneholdt 130 mM NaCl. For en mer omfattende fraksjonisering, kan en gradienteluering (f.eks. 10 kolonnevolumer) fra ekvibreringsbufferen til elueringsbufferen brukes. Fraksjoner ble deretter samlet over elueringsprofilen, og fraksjonene som omfattet elueringstoppen av α -Gal A, ble analysert ved SDS-PAGE og deretter visualisert ved sølvflekking. Artene med lavest molekylvekt som ble observert på gelen, eluerte i vaskevannet og i den førende kant av toppen, mens glykoformene med høyest molekylvekt eluerte mot slutten av toppen. Artene med lavere molekylvekt tilsvarer de mindre negativt ladede glykoformer av α -Gal A, som bindes mindre sterkt til den positivt ladede Q-"Sephacrose"-kolonne (omfattende en kvaternær amin-substituert harpiks). α -Gal A-arterne med høyest negativ ladning ble eluert senere i elueringsprofilen, og har en høyere molekylvekt ifølge en SDS-PAGE-analyse. Fraksjoneringen i henhold til ladningen ble bekreftet ved en isoelektrisk fokusering av de eluerte fraksjoner eller av utvalgte samlinger.

Dermed muliggjorde både en fraksjonalisering i henhold til størrelsen og en fraksjonalisering i henhold til ladningen et utvalg av høyt ladede glykoformer av α -Gal A.

2.5 Mannose- eller mannose-6-fosfat (M6P)-mediert internalisering av α -Gal A

5 For at α -Gal A som er blitt fremstilt i stabilt transfiserte celler, skal kunne være et virksomt terapeutisk middel mot α -Gal A-mangler, må enzymet internaliseres i de rammede celler. α -Gal A er minimalt aktivt ved fysiologiske pH-nivåer, f.eks. i blodet eller i interstitielle væsker. α -Gal A metaboliserer akkumulerte lipidsubstrater optimalt bare når det er internalisert i det sure miljø av lysosomen. Denne interna-

10 lisering medieres av bindingen av α -Gal A til M6P-reseptorer som uttrykkes på celleflaten og leverer enzymet til lysosomen via den endocytiske bane. M6P-reseptor uttrykkes ubikvitært; de fleste somatiske celler uttrykker M6P i noen grad. Mannosereseptor, som er spesifikk for blottede mannoseresiduer på glykoproteiner, er mindre alminnelig utbredt. Mannosereseptorene finnes generelt kun på makrofager

15 og makrofaglignende celler, og gir en ytterligere måte for α -Gal A å tre inn i disse celletyper.

For å demonstrere den M6P-medierte internalisering av α -Gal A, ble hudfibroblaster fra en pasient med Fabrys sykdom (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository) dyrket over natten i nærvær av økende konsentrasjoner av rensset α -Gal A. Noen av

20 prøvene inneholdt 5 mM løselig M6P, som kompetitivt inhiberer bindingen til og internalisering via M6P-reseptor. Andre prøver inneholdt 30 mg/ml mannan, som inhiberer bindingen til og internaliseringen via mannosereseptor. Etter inkubasjonen ble cellene vasket og samlet ved å skrape dem inn i lysisbuffer (10 mM Tris, pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM "Pefabloc" (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) og 1% NP-40). De sprengte prøver ble deretter testet for proteinkonsentrasjon og α -Gal A-aktivitet. Resultatene uttrykkes som enheter α -Gal A-aktivitet/mg

25 celleprotein. Fabry-cellene internaliserte α -Gal A på doseavhengig måte. Denne internalisering ble inhibert med M6P, men det fant ikke sted noe inhibering med mannan. Derfor medieres internaliseringen av α -Gal A i Fabry-fibroblaster av M6P-

30 reseptor, men ikke av mannose-reseptor.

α -Gal A internaliseres også *in vitro* i endotelceller, som er viktige mål for behandling av Fabrys sykdom. Humane endotelceller fra navlestrengene (HUVEC) ble dyrket over natten med 7500 enheter α -Gal A; noen av brønnene inneholdt M6P. Etter inkubasjonsperioden ble cellene samlet og testet for α -Gal A som beskrevet

ovenfor. Cellene som var blitt inkubert med α -Gal A, hadde nesten 10 ganger høyere enzymnivåer enn kontrollcellene (ingen inkubasjon med α -Gal A). M6P inhiberte den intracellulære oppsamling av α -Gal A, hvilket tyder på at internaliseringen av α -Gal A i HUVEC'er medieres av M6P-reseptor. Dermed internaliseres det humane α -Gal A av klinisk relevante celler.

Få dyrkede humane cellelinjer er kjent for å uttrykke mannosereseptor. Imidlertid kan en muse-makrofag-lignende cellelinje (J774.E), som bærer mannosereseptorer, men få eller ingen M6P-reseptorer, brukes til å bestemme om det rensede α -Gal A internaliseres via mannosereseptor. Diment *et al.*, *J. Leukocyte Biol.* 42: 485-490 (1987). J774.E-celler ble dyrket over natten i nærvær av 10.000 enheter/ml α -Gal A. Utvalgte prøver inneholdt også 2 mM M6P, og andre inneholdt 100 mg/ml mannan. Cellene ble vasket og samlet som beskrevet ovenfor, og det samlede proteininnhold og α -Gal A-aktiviteten av hver prøve ble bestemt. M6P inhiberer ikke opptaket av α -Gal A i disse celler, mens mannan nedsetter nivået av akkumulert α -Gal A med 75%. Dermed kan α -Gal A internaliseres via mannosereseptor i cellyper som uttrykker denne bestemte celleoverflatereseptor.

Eksempel 3 Farmasøytisk formulering

α -Gal A, rensset, bulk, fortynnes til den endelige konsentrasjon med α -Gal A-fortynningsmiddel. På grunnlag av volumet av rensset bulk som skal formuleres, konsentrasjonen av α -Gal A (mg/ml) og den ønskede konsentrasjon av α -Gal A i den endelige formulering, beregnes volumet av α -Gal A-fortynningsmiddel som er nødvendig. α -Gal A-fortynningsmiddel fremstilles innen 24 timer før bruk ved å blande egnede mengder WFI, natriumklorid og natriumfosfat, monobasisk, og justere pH til 6,0 med natriumhydroksidoppløsning. Sammensetningen av α -Gal A-fortynningsmidlet oppgis i tabell 8.

Tabell 8
Sammensetning av α -Gal A-fortynningsmidlet (pr. liter)

Bestanddel	Delenummer	Mengde
Natriumklorid (USP)	100-1916	8,8 g
Natriumhydroksid, 5N	200-1903	qs for å justere pH til 6,0
Natriumfosfat, monobasisk (USP)	100-1913	3,5 g
Vann for injeksjon (USP)	100-2301	qs ad 1,0 l

5 Én liter eller et mindre volum α -Gal A-fortynningsmiddel filtreres ved vakuumfiltrasjon ved bruk av sterile 0,2 mm nylonfiltre (Nalge Nunc International, Rochester, NY). Større volumer filtreres ved positivt trykk ved bruk av en peristaltisk pumpe og 0,2 mm "Supor"-kapsselfiltre (Pall, Port Washington, NY). Alle filtrene underkastes en post-filtrasjons boblepunkt-integritetstesting. Blandings- og filtrasjonstrinnene utføres i en sertifisert klasse 100-laminærstrømningshette. α -Gal A-

10 fortynningsmiddel tilsettes til α -Gal A i rensed bulkform i et blandekar for å gi en 1 mg/ml endelig oppløsning. Deretter tilsettes det egnede volum polysorbat 20 (Tween 20, Spectrum) for å oppnå en endelig konsentrasjon på 0,02%.

Eksempel 4 Desialylert degalaktosylert α -Gal A

15 For å undersøke virkningen av glykosylasjon på biofordelingen av α -Gal A, ble et rensed preparat av α -Gal A sekvensielt deglykosylert, og hver form ble injisert i mus. Organene av musene ble samlet fire timer etter injeksjonen, og det ble utført immunohistokjemi på vevene for å visualisere mulige endringer i biofordelingen av proteinet.

20 α -Gal A ble først behandlet med neuraminidase (sialidase) for å fjerne sialyresiduer, hvilket etterlot seg blottlagte galaktoseenheter. En del av dette sialidase-behandlede materiale ble ytterligere behandlet med β -galaktosidase for å fjerne galaktoseresiduer; dette etterlot seg blottlagte N-acetylglukosamid (GlcNAc)-residuer. GlcNAc'ene ble deretter fjernet ved bruk av N-acetylglukosaminidase, hvilket etterlot seg kjerne-mannosegruppene på proteinet. Ubehandlet α -Gal A (kontroll) eller

25 en av de behandlede former for proteinet ble injisert i mus via halevenen. Fire timer etter injeksjonene, ble lever, milt, hjerte, nyre og lungene fra musene samlet, konserveret og immunoflekket for å påvise α -Gal A.

Sammenlignet med kontrolldyr som fikk ubehandlet protein, hadde mus som fikk det sialidase-behandlede protein (galaktoseresiduer blottlagt) mer α -Gal A i leveren og tilsvarende mindre av enzymet i de øvrige undersøkte organer. I tillegg var flekkingsmønstret i leveren helt forskjellig. I kontrolldyr var α -Gal A primært lokalisert i Kupffer-celler og endotelceller, men kun moderat flekking av hepatocytter. I dyr som fikk det sialidase-behandlede α -Gal A, fantes enzymet kun i hepatocytterne, hvilket stemmer overens med den kjente biofordeling av asialoglykoproteinreseptor. Denne virkning av en deglykosylasjon på biofordelingen ble omgjort når galaktoseresiduen ble fjernet ved hjelp av β -galaktosidase. Fargingsmønstret som ble observert i leveren av musene som fikk dette protein uten galaktoseenheter, lignet fargingen i kontrolldyrene; hovedparten av fargingen ble funnet i Kupffer-celler og endotelceller, med en minimal hepatocytt-flekking. En videre behandling av α -Gal A med N-acetylglukosaminidase endret ikke fargingsmønstret fra hva som ble observert for det β -galaktosidase-behandlede protein; dvs. fjerning av N-acetylglukosaminresiduen virket å ha liten effekt på biofordelingen av α -Gal A.

Eksempel 5 Korrigerende av Fabry-fibroblaster med humane fibroblaster som uttrykker α -Gal A

For genterapi må et implantat av autologe celler som produserer α -Gal A, produsere enzymet i form av en form som er modifisert på riktig måte for å "korrigere" α -Gal A-mangelen i målcellene. For å bedømme virkningen av en α -Gal A-produksjon av transfiserte humane fibroblaster på Fabry-celler, ble fibroblaster som var samlet fra pasienter med Fabrys sykdom (NIGMS Human Genetics Mutant Cell Repository) dyrket sammen med en α -Gal A-produksjonsstamme (BRS-11) i "Transwells" (Costar, Cambridge, MA). Fabry-cellene ble dyrket i 12-brønners vekstskåler, hvorav noen inneholdt innføyelser ("Transwells", 0,4 mm porøse) som hadde en overflate som celler kan dyrkes på. Vekstmatriksen av innføyelsen er porøs og lar makromolekyler passere fra det øvre til det nedre miljø. Ett sett av innføyelser inneholdt normale humane forhud (HF)-fibroblaster, som utsondrer minimale mengder α -Gal A, mens et annet sett inneholdt den stabilt transfiserte humane fibroblaststamme BRS-11, som utsondrer store mengder α -Gal A. I celler som dyrkes sammen med α -Gal A-produksjonsceller, kan α -Gal A tre inn i mediet som dekker Fabry-cellene, og potensielt internaliseres i Fabry-cellene.

Dataene i tabell 9 viser at Fabry-cellene internaliserte det utsondrede α -Gal A. Det intracellulære nivå av α -Gal A ble overvåket i 3 dager. Cellene som var blitt dyrket alene (ingen innføyelse) eller i nærvær av ikke-transfiserte forhud-fibroblaster (HF-

innføyelse), hadde et meget lavt intracellulært nivå av α -Gal A-aktivitet. Fabry-cellene som var blitt dyrket med α -Gal A-produksjonscellene (BRS-11-innføyelse), oppviste imidlertid etter dag 2 enzymnivåer som lignet nivået i normale celler (normale fibroblaster har 25-80 enheter α -Gal A prl. mg protein). At korrigeringen kan tilskrives α -Gal A som er blitt tatt opp via M6P-reseptor, demonstreres av inhiberingen med M6P (BRS-11-innføyelse + M6P).

Tabell 9

Korrigering av Fabry-fibroblaster ved hjelp av humane fibroblaster som uttrykker α -Gal A-aktivitet
(enheter/mg samlet protein)

Tid	ingen innføyelse	HF-innføyelse	BRS-11-innføyelse	BRS-11-innføyelse + M6P
Dag 1	2 ± 1	2 ± 1	13 ± 1	4 ± 1
Dag 2	2 ± 1	2 ± 1	40 ± 1	6 ± 2
Dag 3	2 ± 1	5 ± 1	85 ± 1	9 ± 1

P a t e n t k r a v**P a t e n t k r a v**

1. Anvendelse av et α -Gal A-preparat ved fremstilling av et medikament for be-
5 handling av en α -Gal A-defisiens, hvor nevnte medikament er for administrasjon av
en dose på mellom 0,1 til 0,3 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av
et individ.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte medikament er for administrasjon av en
dose på 0,2 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av et individ.
- 10 3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte dose er formulert for administrasjon in-
tramuskulært, oralt, rektalt, subkutant, intra-arterielt, intraperitonealt, intrace-
rebralt, intranasalt, intratekalt, intramukosalt, transdermalt eller via inhalering.
4. Anvendelse ifølge krav 1, hvor α -Gal A-preparatet har en spesifikk aktivitet på
minst $2,0 \times 10^6$ enheter/mg protein.
- 15 5. Anvendelse ifølge krav 1, hvor preparatet er renset til minst 98% homogenitet
som målt med SDS-PAGE eller revers fase HPLC.
6. Anvendelse ifølge krav 1, hvor preparatet er renset til minst 98% homogenitet
som målt med SDS-PAGE eller revers fase HPLC, og har en spesifikk aktivitet på
minst $2,0 \times 10^6$ enheter/mg protein.
- 20 7. Anvendelse ifølge krav 1, hvor minst 67% av de totale glykaner av α -Gal A gly-
koformene av nevnte preparat er kompleks-type glykaner.
8. Anvendelse ifølge krav 1, hvor de humane α -Gal A-glykoformer omfatter et
gjennomsnitt på to komplekse glykaner per α -Gal A-monomer.
9. Anvendelse ifølge krav 1, hvor mer enn 50% av de totale glykaner av α -Gal A-
25 glykoformene er sialylert.

10. Anvendelse ifølge krav 1, hvor α -Gal A-materialet er oppnådd fra isolerte humane celler genetisk modifisert til å uttrykke et α -Gal A-polypeptid.
11. Anvendelse ifølge krav 10, hvor de humane celler er sekundære fibroblaster.
12. Anvendelse ifølge krav 1, hvor de humane α -Gal A-glykoformer består av mellom omkring 50% til 70% komplekse glykaner med 2-4 sialinsyreresiduer.
13. Anvendelse ifølge krav 1, hvor preparatet har en spesifikk aktivitet på minst $2,0 \times 10^6$ enheter/mg protein og er fremstilt ved en fremgangsmåte av:
- (a) å fremskaffe isolerte humane celler som er genetisk modifisert til å uttrykke et α -Gal A-polypeptid; og
- (b) å opprense α -Gal A-polypeptidet fra den humane celle eller et dyrkningsmedium av den humane celle.
14. Anvendelse ifølge krav 13, hvor preparatet er renset til minst 98% homogenitet som målt med SDS-PAGE eller revers fase HPLC.
15. Anvendelse ifølge krav 13, hvor minst 67% av de totale glykaner av α -Gal A-glykoformene av nevnte preparat er kompleks-type glykaner.
16. Anvendelse ifølge krav 13, hvor α -Gal A-glykoformene omfatter et gjennomsnitt av to komplekse glykaner per α -Gal A-monomer.
17. Anvendelse ifølge krav 13, hvor mer enn 50% av de totale glykaner av α -Gal A-glykoformene er sialylert.
18. Anvendelse ifølge krav 13, hvor den isolerte humane celle som er genetisk modifisert, er transfektert med et α -Gal A/pattedyr ekspresjonsvektorkonstrukt.
19. Anvendelse ifølge krav 13, hvor den isolerte humane celle som er genetisk modifisert, er transfektert med en nukleinsyre som koder for et regulatorisk element som kontrollerer ekspresjon av en kodende sekvens for α -Gal A.
20. Anvendelse ifølge krav 13, hvor den isolerte humane celle som er genetisk modifisert, er sekundære fibroblaster.

21. Anvendelse ifølge krav 13, hvor opprensning av α -Gal A-polypeptidet omfatter å anvende minst en av opprenskningsmetodene valgt fra gruppen bestående av: hydrofobisk interaksjons-kromatografi, ionisk interaksjons-kromatografi, størrelses-ekskluderings-kromatografi, kromatofokuserende kromatografi, metallchelatkromatografi og affinitetskromatografi.
22. Anvendelse ifølge krav 21, hvor opprensningen av α -Gal A-polypeptidet ytterligere omfatter trinnet med fraksjonering av en α -Gal A-glykoform.
23. Anvendelse ifølge krav 1, hvor dosen er egnet til å administreres to ganger ukentlig.
24. Anvendelse ifølge krav 1, hvor dosen er egnet til å administreres ukentlig.
25. Anvendelse av et α -Gal A-preparat ved fremstilling av et medikament for behandling av en α -Gal A-defisiens, hvor nevnte medikament er for subkutan administrasjon av en dose på mellom 0,1 til 0,3 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av et individ.
26. Anvendelse ifølge krav 3 eller 25, hvor nevnte dose er formulert for administrasjon under anvendelse av et avleveringssystem valgt fra gruppen bestående av pumpe-avlevering, innkapslet celleavlevering, liposomal avlevering, nål-avlevert injeksjon, nålfri injeksjon, nebulisator, aerosolisator, elektroporering og transdermalt plaster.
27. Anvendelse av et α -Gal A-preparat ved fremstilling av et medikament til behandling av Fabrys sykdom, hvor nevnte medikament er for administrasjon av en dose på mellom 0,1 til 0,3 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av et individ.
28. Anvendelse ifølge krav 27, hvor nevnte medikament er formulert for subkutan administrasjon.
29. Anvendelse ifølge krav 27, hvor individet oppviser symptomer på Fabrys sykdom.
30. Anvendelse ifølge krav 27, hvor individet oppviser et symptom på klassisk Fabrys sykdom.

31. Anvendelse ifølge krav 27, hvor individet oppviser et symptom på hjertesvikt.
32. Anvendelse ifølge krav 27, hvor individet oppviser et symptom på nyresvikt.
33. Anvendelse ifølge krav 27, hvor individet oppviser minst et symptom valgt fra gruppen bestående av korneal dystrofi, angiokeratomata, smertefull nevropati, cerebral vaskulær sykdom, kardiomyopati, venstre ventrikulær hypertrofi, anstrengelsesrelatert dyspnea, asymmetrisk septal hypertrofi, myokardialt infarkt, myokardial infiltrasjon og mitralklaff-insuffisiens.
34. Anvendelse av et α -Gal A-preparat ved fremstilling av et medikament for behandling av en atypisk variant av Fabrys sykdom, hvor nevnte medikament er for administrasjon av en dose på mellom 0,1 til 0,3 mg av nevnte α -Gal A-preparat pr kg kroppsvekt av et individ.
35. Anvendelse ifølge krav 29, hvor nevnte pasient lider av en kardiovaskulær abnormalitet.
36. Anvendelse ifølge krav 35, hvor nevnte kardiovaskulære abnormalitet er venstre ventrikulær hypertrofi (LVH).
37. Anvendelse ifølge krav 25, 27 eller 29, hvor nevnte medikament er for administrasjon av en dose på 0,2 mg av nevnte α -Gal A-preparat per kg kroppsvekt av et individ.
38. Anvendelse ifølge krav 1, 2, 25, 27, 29 eller 32, hvor medikamentet er for ukentlig eller to ganger ukentlig administrasjon.

377789

01-11-15*008*01-11-10

CTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGA
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCA
GTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTA
ATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGA
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCAC
AGGCACGTTTGTTCAGCTAGA

FIG. 1

ATTGGTCCGCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC

CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC

CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCCT

TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC

CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NcoI

GCAAGGACGCCTACCATGGGCTGGCTGCAC

TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC

AGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCA

FIG. 2

1 CCGGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC
 61 ATCTGGGCTG CGCGCTTGGG CTTGCTTCC TGGCCCTCGT TTCTGGGAC ATCCCTGGGG
 121 CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC
 181 GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT
 241 TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC
 301 TCTGCATTGA TGA CTGTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTCAGGCAG
 361 ACCCTCAGCG CTTTCTCAT GGGATTGCC AGCTAGCTAA TTATGTTTAC AGCAAAGGAC
 421 TGAAGCTAGG GATTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT
 481 TTGGTACTA CGACATTGAT GCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAAT
 541 TTGATGTTG TTA CTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT
 601 TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT
 661 GGCCCTTTC AAGGCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT
 721 TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGATAT CTGGACTGG ACATCTTTTA
 781 ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG
 841 TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCYGGGCTA
 901 TCATGGCTGC TCCTTATTC ATGCTAATG ACCTCOGACA CATCAGCCCT CAAGCCAANG
 961 CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT
 1021 ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT
 1081 GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGCAGGAGA TGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATGCGAG
 1141 TTGCTTCCCT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTTATCACA CAGCTCCTCC
 1201 CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGA CTTCAG GTTAAAGAAGT CACATAAATC
 1261 CCACAGGCAC TGT TTTGCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATEA AAAGACTTAC
 1321 TTTAAAAAA AAAAAAATC GAG

FIG. 3

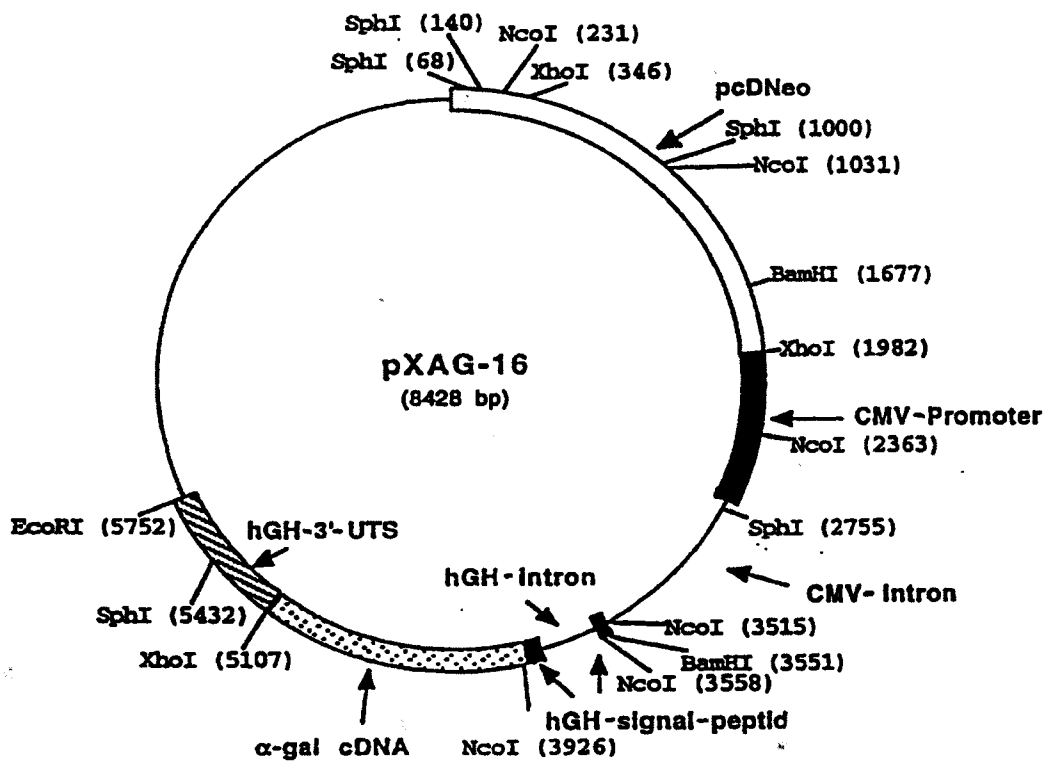


FIG. 4

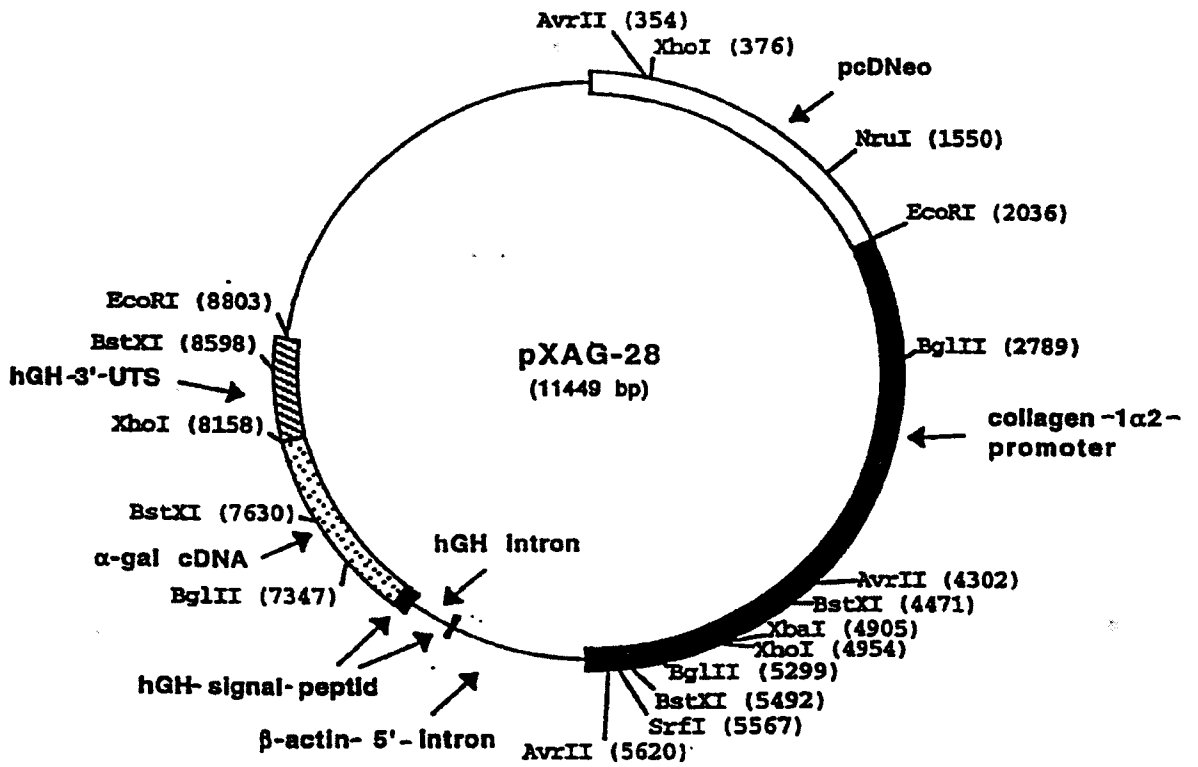


FIG. 5

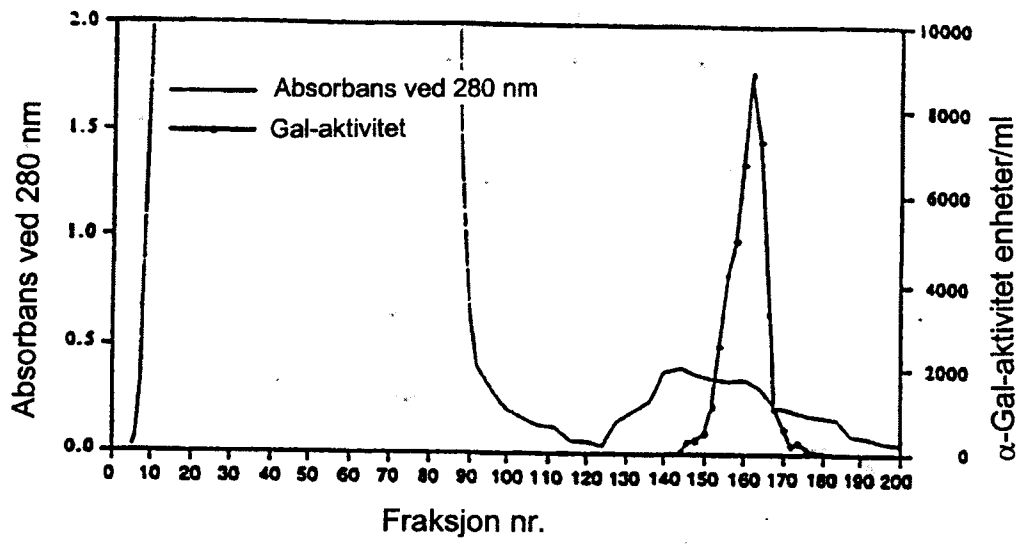
Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly
 Trp Leu His Trp Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp
 Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile Ser Glu Lys
 Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
 Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile
 Asp Asp Cys Trp Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu
 Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg Phe Pro His
 Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
 Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn
 Lys Thr Cys Ala Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr
 Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala Asp Trp Gly
 Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
 Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met
 Ser Leu Ala Leu Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val
 Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met Trp Pro Phe
 Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
 Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser
 Trp Lys Ser Ile Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser
 Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val Ala Gly Pro
 Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
 Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln
 Met Ala Leu Trp Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe
 Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser Pro Gln Ala
 Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
 Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu
 Arg Gln Gly Asp Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro
 Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala Met Ile Asn
 Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
 Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn
 Pro Ala Cys Phe Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys
 Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr Ser Arg Leu
 Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
 Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp
 Leu Leu

FIG. 6

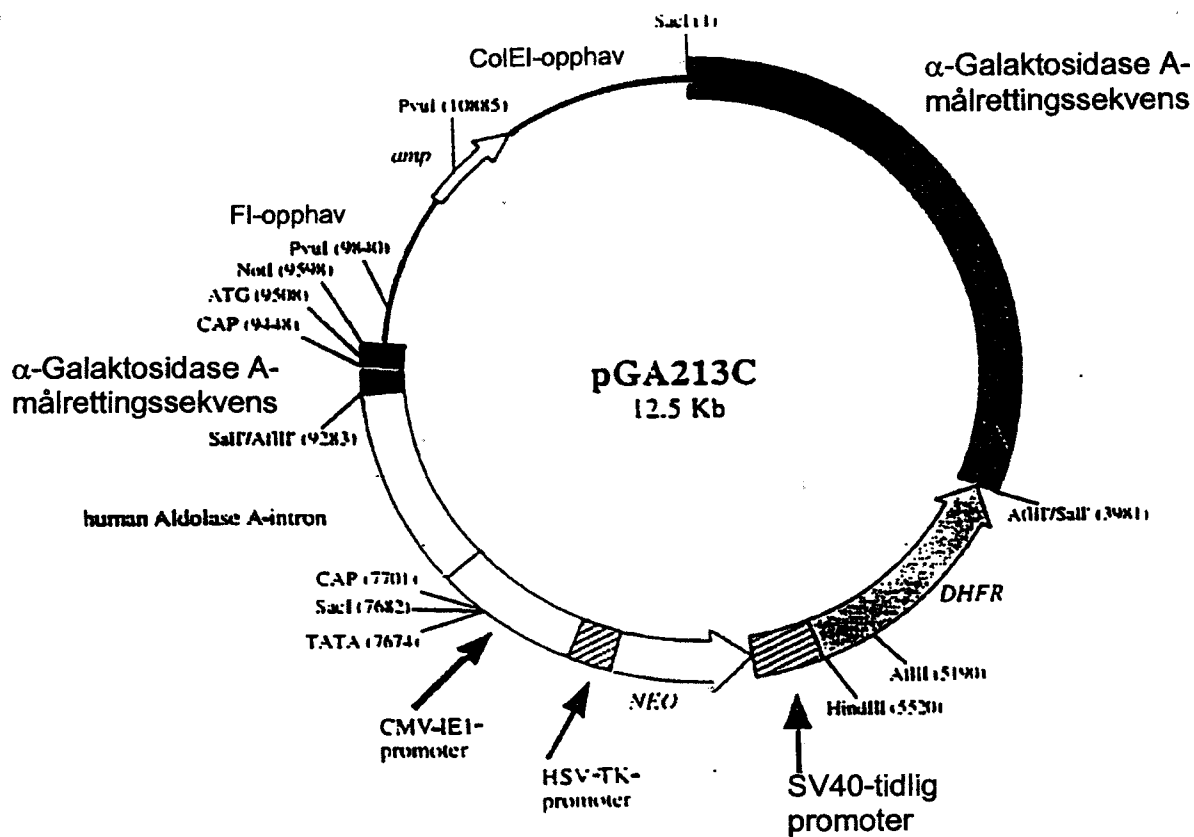
01-11-000001-11-10

1 CTGGACAATG GATTGCAAG GACCCCTACC ATGGCTGGC TGCCTGGGA GCGCTTCATG
61 TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAACT CTTCATGGAG
121 ATGCCAGAGC TCATGGTCTC AGAAAGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT
181 GATGACTGTT GATGGCTCC CCAAAGAGAT TCAGAAAGCA GACTTCAAGC AGACCCCTAG
241 CGCTTTCTC ATGGGATTCC CCAGCTAGCT AATTATGTT ACAGCAAAAG ACTGAAGTA
301 GGGATTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCCAGGCT TCCTGGGAG TTTGGATAC
361 TACCACATTG ATGCCAGAC CTTTCTGAC TGGGAGTAG ATCTCTAAA ATTTGATGGT
421 TGTACTGTG ACAGTTTGA AAATTGGCA GATGTTATA AGCACATGC CTGGCCCTG
481 AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGACTCC TGTGAGTGC CTCTTATAT GTGCCCTTT
541 CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACG TACTGCAATC ACTGGGAAA TTTGCTGAC
601 ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTT TAACCAGGAG
661 AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAAAGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC
721 AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAOCAAGTA ACTCAGATGG CCTCTGGGC TATCATGGCT
781 GCTCCTTAT TCATGCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAGCCAA AGCTCTCCTT
841 CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT
901 AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGAA CGACCTCTCT CAOGCTTAGC CTGGGCTGTA
961 GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGOTGA CCTCGCTCTT ATACCATCGC AATTGCTTCC
1021 CTGGGTAAAQ GAGTGGCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA
1081 AGAAAGCTAG GGTCTATGA ATGACTTCA AGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC
1141 ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA

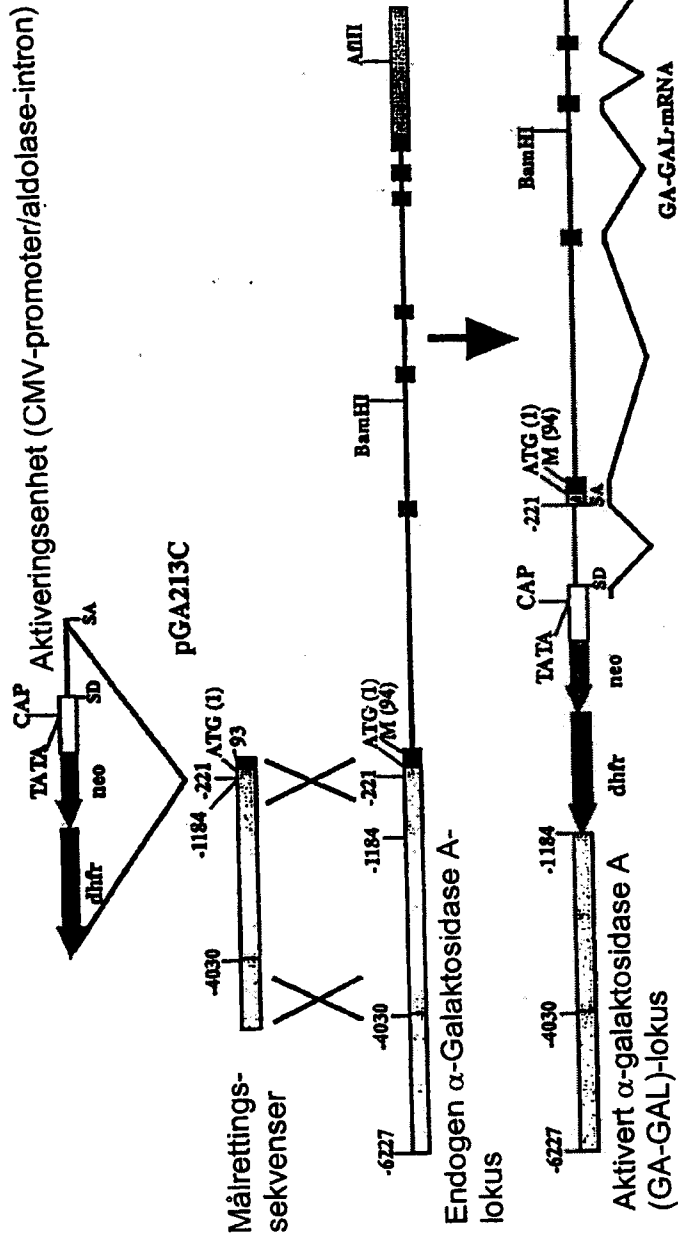
FIG. 7

**FIGUR 8**

FIGUR 9 α -Galaktosidase A-genaktiveringskonstrukt pGA213C



Aktivering av human α -galaktosidase A-lokus ved homolog rekombinasjon



FIGUR 10