

ÖZET**ALFA-MANNOSİDAZIN TIBBİ KULLANIMI**

Mevcut buluşun, lizozomal depolama bozukluğu alfa-mannosidozu enzim replasman
5 terapisi ile tedavi etmek için araçlar ve stratejiler sağlar. Özel olarak, buluş santral sinir
sistemindeki hücrelerde depolanmış nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin
azaltılması ile ilgilidir. Bu doğrultuda, mevcut buluş santral sinir sisteminin bir veya
birden fazla bölgesindeki hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin
intraselüler düzeylerini düşürmek amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal
10 alfa-mannosidazın kullanımını sağlar. Buluş ilaveten, santral sinir sisteminin bir veya
birden fazla bölgesindeki hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin
intraselüler düzeylerini düşürmek amacıyla bir ilaç olarak kullanılması için lizozomal
alfa-mannosidazın bir formülasyonunu sağlar. Ayrıca, buluş bir süjenin santral sinir
sisteminin bir veya birden fazla bölgesindeki hücrelerde nötral mannoz açısından
15 zengin oligosakkaritlerin intraselüler düzeylerini düşürmenin bir yöntemini sağlar, söz
konusu yöntem söz konusu süjeye lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunu
uygulamayı içerir. Son olarak, buluş bir alfa-mannosidazı üretmenin, izole etmenin ve
saflaştırmanın yöntemleri aynı zamanda bu yöntemlere göre elde edilebilen bir alfa-
mannosidazın kullanımı ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Alfa-mannosidozun tedavisi amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa-mannosidazın kullanımı olup, özelliği söz konusu ilaç intravenöz uygulama ile uygulanacak olmasıdır.
5
2. İstem 1'e göre kullanım olup, özelliği ilaç infüzyon veya 1 ila 5 günlük enjeksiyonlara, haftada bir 1 ila 5 enjeksiyona, 2 haftada bir 1 ila 5 enjeksiyona veya her ay bir 1 ila 5 enjeksiyona karşılık gelen bir sıklıkta tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile uygulanacak olmasıdır.
10
3. İstem 1'e veya istem 2'ye göre kullanım olup, özelliği söz konusu ilaç santral sinir sistemindeki hücreleri hedef almaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içermemesidir.
15
4. İstemler 1-3'ten herhangi birine göre kullanım olup, özelliği lizozomal alfa-mannosidaz SEQ ID NO: 1 amino asit dizisini içermesidir.
5. İstemler 1-4'ten herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu ilaç haftada bir 1-5 enjeksiyona karşılık gelen bir sıklıkta uygulanacak olmasıdır.
20
6. İstemler 1-5'ten herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu ilaç, santral sinir sistemindeki hücrelerin hedef alınması için bir bileşen içermemesidir ve kan-beyin bariyerini geçiş için vehikül olarak etki etme yetisi olan bir bileşen içermez.
25
7. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu ilaç, tedavi edilecek olan süjenin vücut ağırlığının her bir gramı için 5 ila 300 mU lizozomal alfa-mannosidaz aralığındaki bir miktarda uygulanmasıdır.
30
8. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu ilaç, tedavi edilecek olan süjenin vücut ağırlığının her bir gramı için 20 ila 100 mU lizozomal alfa-mannosidaz aralığındaki bir miktarda uygulanmasıdır.

9. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu lizozomal alfa-mannosidazın bir fraksiyonu, mannoz 6-fosfat rezidüleri taşıyan bir veya birden fazla N-bağlı oligosakkaride sahip olan lizozomal alfa-mannosidazdan oluşmasıdır.
- 5
10. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunun aktivitesinin %1'i ile 75'ine karşılık gelen bir fraksiyon mannoz-6-fosfat-reseptörünü bağlanmasıdır.
- 10
11. İstem 10'a göre kullanım olup, özelliği söz konusu fraksiyon, lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunun aktivitesinin %10'u ile %50'sine karşılık gelmesidir.
- 15
12. İstem 10'a göre kullanım olup, özelliği söz konusu fraksiyon, lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunun aktivitesinin %20'si ile %40'ına karşılık gelmesidir.
- 20
13. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu lizozomal alfa-mannosidaz, bir rekombinant enzim olmasıdır.
- 25
14. Önceki istemlerin herhangi birine göre kullanım olup, özelliği söz konusu lizozomal alfa-mannosidaz bir memeli hücresi sisteminde üretilmesidir.
- 25
15. İstem 14'e göre kullanım olup, özelliği söz konusu memeli hücresi sistemi, bir CHO hücre hattı olmasıdır.

TARİFNAME

ALFA-MANNOSİDAZİN TIBBİ KULLANIMI

BULUŞUN SAHASI

5

Mevcut buluşun, lizozomal depolama bozukluğu alfa-mannosidozu enzim replasman terapisi ile tedavi etmek için araçlar ve stratejiler sağlar. Özel olarak, buluş santral sinir sistemindeki hücrelerde depolanmış nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin azaltılması ile ilgilidir.

10

BULUŞUN ALTYAPISI

Alfa-mannosidoz

15 Alfa-mannosidoz, yaklaşık 1/1.000.000 ve 1/500.000. aralığındaki bir sıklık ile dünya genelinde meydana gelen bir resesif, otozomal hastalıktır. Mannosidoz, Avrupa'da, Amerika'da, Afrika'da ve aynı zamanda Asya'da tüm etnik gruplarda bulunur. Lizozomal depolama bozuklukları için iyi bir tanısal servisi olan tüm ülkelerde benzer bir sıklıkla saptanır. Bunlar görünüş olarak sağlıklı doğarlar, bununla birlikte, hastalıkların

20 semptomları progresiftir. Alfa-mannosidoz, çok ciddi ila çok hafif formlar aralığında klinik heterojenlik gösterir. Tipik klinik semptomlar aşağıdakilerdir: mental retardasyon, iskeletsel değişiklikleri, reküran enfeksiyonlar ile sonuçlanan bozulmuş immün sistem, duyma bozukluğu ve sıklıkla hastalık, bir tipik fasiyal karakteristikler, örneğin, bir kaba yüz, bir çıkık alın, bir düzleştirilmiş nazal köprü, bir küçük burun v bir geniş ağız, ile

25 ilişkilidir. En şiddetli olgularda (mannosidoz tip 1), çocuklar hepatosplenomegaliden muzdariptir ve bunlar yaşamlarının birinci yılında ölür. Büyük olasılıkla, bu erken ölüm, hastalıktan kaynaklanan immün-yetmezlikten dolayı şiddetli enfeksiyonlardan kaynaklanır. Daha hafif olgularda (mannosidoz tip 2), hastalık genel olarak, erişkin yaşa erişir. Hastaların iskeletsel zayıflıkları, 20 ila 40 yaşları arasında tekerlekli

30 sandalye ihtiyaçları ile sonuçlanır. Hastalık, beynin sıklıkla, hiç bir şeyi dışlamayan, ancak en temel basit okuma ve yazma yeteneklerini dâhil eden zayıf mental performanslar ile sonuçlanan bir difüz fonksiyon bozukluğuna neden olur. Duyma yetisizlikleri ve başka klinik gösterimler ile ilişkili olan bu problemler, hastanın bağımsız bir yaşamı olmasını önler, bunun sonucu olarak yaşam boyu bakıcıya gerek duyulur.

35

Lizozomal alfa-mannosidaz

Alfa-mannosidoz, lizozomal alfa-mannosidazın (LAMAN, EC3.2.1.24) bir kusurlu aktivitesinden kaynaklanır. Hastalık, mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin, yani, bunların indirgemeyen uçlarında α 1,2-, α 1,3- ve α 1,6-mannosil rezidüleri taşıyan oligosakkaritlerin, masif intraselüler birikimi ile karakterize edilir. Bu oligosakkaritler ağırlıklı olarak, N-bağlı oligosakkaritler içeren glikoproteinlerin intra-lizozomal parçalanmasından köken alır. Bununla birlikte, bazıları, dolikol-bağlı oligosakkaritlerin katabolizmasından ve proteazom tarafından parçalanması için sitosole yönlendirilen yanlış katlanmış glikoproteinlerden köken alır (4, 5). Lizozomal depolama, tüm beyin bölgelerindeki nöronları içeren, çok çeşitli hücre tiplerinde ve dokularda gözlenir. LAMAN, alfa-D-mannositlerdeki bu uç, indirgemeyen alfa-D-mannoz rezidülerini, N-bağlı glikoproteinlerine sıralı parçalanması sırasında indirgemeyen uçtan hidrolize eden bir ekzoglikosidazdır (Aronson ve Kuranda FASEB J 3:2615-2622. 1989). İnsan enzimi, 15, 42 ve 70 kDa'luk üç ana glikopeptide işlenen 49 rezidülük bir varsayımsal sinyal peptidi ile 1011 amino asitlik bir tek polipeptit olarak sentezlenir (Nilssen et al., Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997).

Lizozomal alfa-mannosidaz geni

LAMAN'ı (MANB) kodlayan gen, kromozom 19'da 19 (19cen-q12) yer alır (Kaneda et al., Chromosoma 95:8-12. 1987). MANB, 21,5 kb'a uzanan 24 ekzondan oluşur (GenBank erişim numaraları U60885-U60899; Riise et al., Genomics 42:200-207 . 1997). LAMAN transkripti, » 3.500 nükleotiddir (nt) ve 1.011 amino asidi şifreleyen bir açık okuma çerçevesi içerir (GenBank U60266.1).

LAMAN'ı şifreleyen insan cDNA'sının klonlanması ve dizilenmesi, üç makalede yayımlanmıştır (Nilssen et al., Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997; Liao et al., J.Biol.Chem. 271, 28348-28358. 1996; Nebes et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. 200, 239-245. 1994). Garip bir şekilde, üç dizi özdeş değildir. Nilssen ve ark.'larının dizisi (erişim # U60266.1) karşılaştırıldığında, pozisyonlar 1670'te ve 1671'de bir valinden aspartik aside sübstitüsyon ile sonuçlanan bir TA'dan AT'ye değişim Liao et al. ve Nebes et al., tarafından bulunmuştur.

Mutasyonlar

1997'de, Nilssen et al., (Hum Mol Genet 6:717-726), bir hayli çok akraba arasında evlilik yapan Filistinli ailede mannosidozu olan iki kardeşten elde edilen fibroblastlarda mutasyona neden olan ilk hastalığı bildirmiştir. Bu iki hastada, hastalığın nedeni, 5 Timidin ile sübstüte edilmiş Adenin nükleotidi ile, gendeki bir nokta mutasyonudur. Bundan sonra, insanlarda hastalık için bir kaç genetik neden bulunmuştur. Alfa-mannosidoza neden neden olan günümüzün mutasyonları, ağırlık olarak Avrupalılar'da, 60'tan fazla hastada karakterize edilmiştir. Bu mutasyonlar, nükleotid sübstitüsyonlarını, silinmelerini ve eklenmelerini kapsayan ve genin 24 ekzonunun 10 çoğuna uzanan her iki tipte çeşitlilik gösterir (Berg et al., Am J Genet 64: 77-88. 1999).

Protein düzeyindeki mutasyonların sonuçları ayrıca, hem aktif yeri hem de katlanmayı etkileyen amino asit sübstitüsyonları ile bir tam olarak inaktif ürün ile sonuçlanan, erken çerçeve kayması ve prematüre durdurma kodonları arasında da çeşitlilik gösterir.

15 Çok sayıda farklı türdeki amino asit dizisi ve enzim yapısı. Türleri karşılaştırırken, bulunan insan ve bovin mutasyonlarının çoğu, insan, sığır, kedi, balina, kuş, morino balığı ve civık mantar gibi bir kaç tür için mannosidaz polipeptidinin bir hayli "korunmuş" bölgesinde yer alır; bu, bu bölgelerin enzim fonksiyonu için çok önemli 20 olduğunu gösterir.

Mutasyonların çok sayıda farklı tipine rağmen, mutasyonların tümünün hücrelerde enzim aktivitesinin benzer tam kaybına neden olduğu görülür. Böylelikle, görünür bir şekilde, klinik şiddet açısından varyasyonlar, enzim aktivitesindeki varyasyonlar ile 25 açıklanamayabilir. Daha ziyade, bu varyasyonlar, organizmanın biriken oligomannositlerin kötü etkilerini tamponlamaya yönelik genel yetisine atfedilen diğer faktörlerden ve hastalarda enfeksiyonları ve diğer klinik semptomları önlemek için ve tedavi etmek için ortamlardan kaynaklanır.

30 Tanı

Alfa-mannosidozun tanısı güncel olarak, klinik değerlendirmeye, idrarda mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin saptanmasına ve çeşitli hücre tiplerinde, örneğin, lökositlerde, fibroblastlarda ve amniyositlerde, alfa-mannosidaz aktivitesinin doğrudan 35 ölçümüne dayanır (Chester et al., In: Durand P, O'Brian J (eds) Genetic errors of

glycoprotein metabolism. Edi-Ermes, Milan, pp 89-120. 1982; Thomas and Beaudet . In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WA, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 5. McGraw-Hill, New York, pp 2529-2562. 1995).

- 5 Semptomlar başlangıçta sıklıkla, hafif-derecede olduğundan ve biyokimyasal tanı zor olduğundan, tanı sıklıkla hastalığın seyrinde geç koyulur. Hastaların ve bunların ailelerinin bir erken tanıdan büyük ölçüde yarar göreceği açıktır.

Hayvan modelleri

10

Alfa-mannosidoz, sığırlarda (Hocking et al., Biochem J 128:69-78. 1972), kedilerde (Walkley et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994) ve gine domuzlarında (Crawley et al., Pediatr Res 46: 501-509, 1999) tarif edilmiştir. Bir fare modeli güncel olarak, alfa-mannosidaz geninin hedeflenmiş bozulması ile üretilmiştir (Stinchi et al., Hum Mol Genet 8: 1366-72, 1999).

15

İnsanlarda olduğu gibi, alfa mannosidazın lizozomal alfa-mannosidazı kodlayan gendeki spesifik mutasyonlardan kaynaklandığı görülür. Berg et al., (Biochem J. 328:863-870.1997), felin karaciğeri lizozomal alfa-mannosidazının saflaştırılmasını ve bunun cDNA dizisinin belirlenmesini bildirmiştir. Aktif enzim, moleküler kütleleri 72, 41 ve 12 kDa olan 3 polipeptitten oluşur. İnsan enzimine benzer şekilde, felin enziminin, 50 amino asitlik bir varsayımsal sinyal peptidi, akabinde matür enzimin 3 polipeptidine yarılan 957 amino asitlik bir polipeptit zinciri olan bir tek-zincirli öncül olarak sentezlendiği gösterilmiştir. Ortaya çıkarılan amino asit dizisi, insan ve bovin dizileri ile

20 bunun cDNA dizisinin belirlenmesini bildirmiştir. Aktif enzim, moleküler kütleleri 72, 41 ve 12 kDa olan 3 polipeptitten oluşur. İnsan enzimine benzer şekilde, felin enziminin, 50 amino asitlik bir varsayımsal sinyal peptidi, akabinde matür enzimin 3 polipeptidine yarılan 957 amino asitlik bir polipeptit zinciri olan bir tek-zincirli öncül olarak sentezlendiği gösterilmiştir. Ortaya çıkarılan amino asit dizisi, insan ve bovin dizileri ile

25 sırasıyla %81,1 ve %83,2 özdeşdir. Bir 4-bp'lik silinme, bir etkilenmiş İran kedisinde tanımlanmıştır; silinme, kodon 583'ten itibaren bir çerçeve-kayması ve kodon 645'te prematüre sonlanma ile sonuçlanmıştır. Kedinin karaciğerinde enzim aktivitesi saptanamayabilir. Daha hafif bir derecede fenotip eksprese eden bir evcil uzun-tüylü kedi, normalin %2'si olan enzim aktivitesine sahiptir; bu kedi 4-bp'lik silinmeye sahip

30 değildir. Tollersrud et al., (Eur J Biochem 246:410-419 .1997), bovin böbrek enzimini homojenite için saflaştırmıştır ve geni klonlamıştır. Gen, 16 kb'a uzanan 24 ekzon hâlinde organize edilmiştir. Gen dizisine göre, bunlar sığırlarda iki mutasyon tanımlamıştır.

Bu arada, α -mannosidaz nakavt fareler, ruhsatlandırma arzını desteklemek için α -mannosidozun araştırmayla ilgili tedavisi için mevcut en iyi farmakolojik modeli sağlar. Güncel olarak canlı hayvanlar kullanmayan kabul edilebilir modeller yoktur.

5 Alfa-mannosidoz terapisine yönelik tıbbi ihtiyaç

Mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin birikmesinden kaynaklanan şiddetli klinik gösterimlerin ışığında, alfa-mannosidoz için etkili tedavinin yokluğu iyi bilinmektedir. Günümüzde, hastalığın tedavisi için majör terapötik opsiyonlar, kemik iliği naklidir ve enzim replasman terapisi.

Kemik iliği nakli

1996'da, Walkley et al., (Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994), 1991'de kemik iliği nakli (BMT) ile tedavi edilen mannosidozu olan 3 yavru kendi hakkında bir makale yayımlamıştır. Kurban edilmiş 2 hayvanda, yalnızca vücut içinde değil, ancak daha önemlisi, aynı zamanda beyin içinde bir normalizasyon görülmüştür. 3. kedi, 6 yıl sonra iyidir. Normal olarak, tedavi edilmemiş bir kedi 3-6 ay içinde ölür. 1987'de, mannosidozu olan bir çocuk, BMT ile tedavi edilmiştir BMT (Will et al., Arch Dis Child 1987 Oct;62(10):1044-9). Hasta, prosedür ile ilgili komplikasyonlardan dolayı 18 hafta sonra ölmüştür. Beyinde, çok küçük enzim aktivitesi bulunmuştur. Bu hayal kırıklığına uğratan sonuç, ölümden önce ağır immünosüpresif tedavi ile veya BMT'den sonra beyinde enzim aktivitesinin artmasının zaman alması ile açıklanabilir. Donör, (taşıyıcı olarak %50'den daha az enzim aktivitesine sahip olması beklenmesi gereken) annedir veya bu, beyinde enzim fonksiyonu üzerinde etkiye sahip olmayan insanda BMT olabilir. Değişken sonuçlara sahip olunmasına rağmen, böylelikle bir kaç kemik iliği nakli teşebbüsü, başarılı yamanmanın, en azından kısmen, alfa mannosidozun klinik gösterimlerini düzeltebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, kemik iliği nakli uygularken ciddi prosedür ile ilişkili komplikasyonları azaltmanın zorluğu, insan terapisinin hâlâ mağlup edilmemiş olmasıdır.

Enzim replasman terapisi

Lizozomal depolama hastalıkları keşfedildiğinde, bunun enzim süstitüsüyonu ile tedavi edilebilmesi umutları yükselir. Enzim replasman terapisi, Gaucher hastalığında

kanıtlanmış etkiye sahiptir. Ekzojen lizozomal glukoserebrosidaz hastaya enjekte edildiğinde, bu enzim enzim-kusurlu hücreler tarafından alınır (Barton et al., N Engl J Med 324:1464-1470). Bu tarz alım, örneğin, hücrelerin yüzeyi üzerinde neredeyse ubikuitöz olan mannoz-6-fosfat reseptörü gibi hücre yüzeyi üzerinde belirli reseptörler ve diğer reseptörler, örneğin, belirli hücre tipleri, örneğin, monosit/makrofaj hücre hattının hücreleri ve hepatositler, ile sınırlandırılan asialoglikoprotein reseptörü ve mannoz reseptörü, tarafından regüle edilir. Bundan dolayı, enzimin hücresel alımı ağırlıklı olarak bunun glikosilasyon profiline bağlıdır. Uygun şekilde tasarlandığında, kusurlu enzim, diyabetik hastaların insülin alması ile aynı şekilde, ekzojen enzimin düzenli enjeksiyonları ile değiştirilebilir. Enzim-kusurlu fibroblastların vasatlarına eklenen saflaştırılmış aktif lizozomal alfa-mannosidaz ile in vitro çalışmalar, lizozomal substrat birikiminin düzeltilmesini göstermiştir. Diğer taraftan, in vivo tedavi kısmen, enzimlerin yeterli miktarını üretme problemi ile ve ekzojen enzime karşı immün reaksiyonlardan kaynaklanan komplikasyonlar ile engellenmiştir. Bununla birlikte, en önemlisi, özel mülahazalar, bir majör nörolojik bileşeni olan lizozomal depolama hastalıkları, örneğin, alfa-mannosidoz, ile ilgili olarak geçerlidir, burada klinik gösterimler, santral sinir sisteminde artırılmış lizozomal depolama ile ilgilidir. Böylelikle, enzim replasman terapisinin, Gaucher hastalığının akut nöronopatik varyantına karşı etkili olduğu kanıtlanmamıştır (Prows et al., Am J Med Genet 71:16-21).

20

Terapötik enzimlerin beyne aktarımı, bu büyük moleküllerin kan-beyin bariyeri yoluyla naklinin olmaması ile önlenir. Kan beyin bariyerinin beyinde terapötik ajanların bir etkisini görmek amacıyla alt edilmesi gerektiğine yönelik genel düşünceden, aktarım sistemlerinin büyük bir çeşitliliğinin kullanılması tasarlanmıştır. Bunlar invasif teknikleri, örneğin, kan beyin bariyerinin örneğin, mannitol, ile ozmotik açılmasını ve invasif olmayan teknikleri, örneğin, kimerik enzimlerin reseptör aracılı endositozunu, içerir. Enzim replasmanının düzenli bir şekilde enzimin uygulanmasını gerektirmesi beklendiğinden, invasif tekniklerin kullanımından kaçınılmalıdır. Diğer taraftan, invasif olmayan tekniklerin kullanılması ümit vadeden sonuçlar sağlamamıştır. Viseral organlarda ve meninkslerde azaltılmış depolamanın beyne taşınan oligosakkaritlerin miktarını azaltılabileceğini düşünülmüştür. Bununla birlikte, bu tarz mülahazaların, burada nörolojik hasarın primer ve şiddetli olduğu lizozomal bozukluklara uygulanabilir olduğu düşünülmez (Neufeld, E. F. Enzyme replacement therapy, in "Lysosomal disorders of the brain (Platt, F. M. Walkley, S. V: eds Oxford University Press). Bu doğrultuda, alfa-mannosidozun etkili bir tedavisini arama hâlâ devam etmektedir.

35

WO 02/099092 (Fogh et al., 2002) ve Berg et al., Molecular Genetics and Metabolism, vol. 73, no. 1, April 2001, pages 18-29, SSS'de mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin intraselüler düzeylerini LAMAN'ı "hücrel membranların üzerine" uygulama ile düşürmek amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa-mannosidazın (LAMAN) kullanımını açıklar.

Fogh et al., 2002, enzim replasman terapisini tartışır ve uygun şekilde tasarlandığında, eksik enzimin diyabetik şekerlerin insülini enjekte etmesine benzer olarak düzenli bir şekilde enjekte edilebileceğini açıklar. Dahası, Fogh et al., 2002 ve Berg et al., 2001, CHO hücrelerinden insan LAMAN'ının ekspresyonunu ve saflaştırılmasını açıklar ve mannosidozu olan bir hastanın fibroblastlarında LAMAN'ın alımını in vitro gösterir. Bununla birlikte, Fogh et al., 2002 ve Berg et al., 2001, spesifik bir sıklıkta tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile uygulamayı açıklamaz.

15

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluşun bir birinci yönü, alfa-mannosidozun tedavisi amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa-mannosidazın kullanımını sağlar, burada söz konusu ilaç, intravenöz uygulama ile uygulanacaktır.

20

Mevcut buluşun bir uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada ilaç infüzyon veya 1 ila 5 günlük enjeksiyonlara, haftada bir 1 ila 5 enjeksiyona, 2 haftada bir 1 ila 5 enjeksiyona veya ayda bir 1 ila 5 enjeksiyona karşılık gelen bir sıklıkta tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile uygulanacaktır.

25

Mevcut buluşun bir ikinci uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu ilaç santral sinir sistemindeki hücreleri hedef almaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içermez.

30

Mevcut buluşun bir üçüncü uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada lizozomal alfa-mannosidaz, SEQ ID NO: 1 amino asit dizisini içerir.

Mevcut buluşun ilave bir uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu ilaç, santral sinir sistemindeki hücrelerin hedef alınması için bir bileşen içermez ve kan-beyin bariyerini geçiş için vehikül olarak etki etme yetisi olan bir bileşen içermez.

- 5 Mevcut buluşun bir başka uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu ilaç, tedavi edilecek olan süjenin vücut ağırlığının her bir gramı için 5 ila 300 mU lizozomal alfa-mannosidaz aralığındaki bir miktarda uygulanır.

- 10 Mevcut buluşun daha başka bir uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu lizozomal alfa-mannosidazın bir fraksiyonu, mannoz 6-fosfat rezidüleri taşıyan bir veya birden fazla N-bağlı oligosakkaride sahip olan lizozomal alfa-mannosidazdan oluşur.

Mevcut buluşun tercih edilen bir uygulaması, kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu lizozomal alfa-mannosidaz, bir rekombinant enzimdir.

15

TANIMLAR VE TERİMLER

- "Bileşen" ile, geniş terimlerde, bütünün bir parçasını oluşturan bir eleman kastedilir. Daha spesifik olarak, terim, bir karışım içinde bulunan bir maddeyi ifade eder. Bu tarz bir madde, kütle olarak belirli oranlarda kimyasal olarak birleştirilmiş elemanlardan oluşturulan bir materyal olarak tanımlanan bir bileşik olabilir. Bileşiklerin örnekleri, inorganik bileşiklerdir, örneğin, küçük moleküler türlerdir, organik bileşiklerdir, örneğin, basit şekerleri ve kompleks polisakkarit polimerlerini içeren karbonhidratlardır, peptitlerdir, proteinlerdir, peptidomimetiklerdir, nükleik asitlerdir ve antikorlardır.

25

"Santral sinir sistemi" terimi, beyni, omuriliği ve spinal sinirleri ifade eder. Santral sinir sistemi, kollardaki, bacaklardaki, kaslardaki ve organlardaki periferik sinirleri içermez.

- 30 Mevcut bağlamda, "beyin" terimi, santral sinir sisteminin, yarı-küreler olarak ifade edilen bunun iki (sağ ve sol) yarısını içeren kafatası içinde yer alan kısmını ifade eder.

- 35 Mevcut bağlamda ayrıca, ekstra-nöral hücreler, örneğin, koroid pleksusun endoteliasındaki ve epitelyasındaki hücreler, santral sinir sisteminin ve beynin parçaları olarak düşünülmemeyecektir. Beyin ve santral sinir sistemi ayrıca, meninksleri de içermez.

"Koroid pleksus", üçüncü, dördüncü ve lateral serebral ventriküllerdeki tela koroideanın bir vasküler proliferasyonudur veya saçığıdır; bu, serebrospinal sıvıyı salgılar, böylece bir dereceye kadar intraventriküler basıncı regüle eder.

5

"Meninksler" terimi, beyni ve omuriliği kaplayan üç membranı ifade eder. Dıştaki meninks, dura mater (sert-zar) olarak adlandırılır ve üçünden en çabuk toparlayandır. Ortadaki tabaka, pia mater (ince zar) olarak adlandırılır ve en-içteki ince tabaka, araknoiddir.

10

"Kompleks" veya "konjugat" ile, bir molekül veya moleküllerin van der Waal etkileşimleri ve/veya elektrostatik etkileşimler ile ve/veya kovalent bağlar ile birbirine tutunan bir grubu kastedilir.

15

"Ekzogen" terimi, organizmaya veya sisteme dışarıdan uygulanan veya organizmanın veya sistemin dışında üretilen bir bileşeni ifade eder; spesifik olarak, terimi, organizma veya sistem içinde sentezlenmeyen bileşenleri ifade eder.

20

"Geçirgen" terimi, bir özel yarı-geçirgen membranı geçebilen bir bileşeni ifade eder. Bu tarz bir yarı-geçirgen membranlar, kan-beyin bariyeri ve/veya fetal-maternal bariyer olabilir.

25

"Kan-beyin bariyeri" ve "kan-serebral bariyer" terimleri, kanı santral sinir sisteminin parankimasından ayıran bariyer sistemini ifade eder.

"Hedefleme" terimi, belirli sinyaller içeren proteinlere sahip olmanın, böylece proteinleri spesifik olarak belirli hücresel lokasyonlara, örn., lizozoma, doğru yönlendirmenin, prosesini ifade eder.

30

DETAYLI AÇIKLAMA

α -mannosidozun özelliği, çok çeşitli dokularda nötral oligosakkaritlerin depolanmasıdır (bakınız, Şekil 2, sütun 1 ve sütun 2). Bu oligosakkaritler, bunların indirgeme ucunda 2-9 mannoz rezidüleri ve bir N-asetilglukozamin rezidüsü içerir ve bundan dolayı bir endoglukozaminidazın etkisinden kaynaklanır. Santral sinir sisteminin ağır tutulumu,

35

alfa-mannosidozun şiddetli infantil formlar ile yalnızca orta-derecede mental retardasyonu olan daha hafif derecede juvenil formlar aralığındaki klinik fenotipinde yansıtılır. Mevcut buluşun arkasındaki gerekçe, rekombinant alfa-mannosidazın tekrarlı intravenöz uygulamasının beyinde depolanmış nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin düzeylerinde göze çarpan bir düşüş ile sonuçlanmasına yönelik ilginç gözlemlerden ortaya çıkar.

Bunun en geniş yönünde, mevcut açıklama, bir rekombinant LAMAN polipeptidi ile ve LAMAN polipeptidini şifreleyen bir nükleotid dizisi ile, polipeptidi eksprese edebilen bir ekspresyon sistemi ile aynı zamanda bunun polipeptidini veya parçasını içeren farmasötik bileşimler ile ve bir süjude Lizozomal alfa-mannosidaz (LAMAN) enziminin bir eksikliğinden kaynaklanan alfa-mannosidoz ile ilgili semptomların gelişmesini önlemek veya tedavi etmek için polipeptidin kullanımı ile ilgilidir.

Bir ana yönünde, buluş, santral sinir sisteminin bir veya birden fazla bölgesindeki, örneğin, beyin içindeki bir veya birden fazla bölgedeki, hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin intraselüler düzeylerini düşürmek amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa-mannosidazın kullanımını sağlar. Nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritler, bir tek N-asetilglukozamin rezidüsüne bağlanmış iki ila dokuz mannoz rezidüsü içerir.

Buluşun bir başka ana yönü, santral sinir sisteminin bir veya birden fazla bölgesindeki hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin intraselüler düzeylerini düşürmek amacıyla bir ilaç olarak kullanılması için bir lizozomal alfa-mannosidazın bir formülasyonu ile ilgilidir.

Buluşun her iki ana yönü için, lizozomal alfa-mannosidazın aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmesi ilaveten tercih edilir:

- (a) SEQ ID NO: 1 amino asit dizisi;
- (b) (a)'daki dizinin, rekombinant insan lizozomal alfa-mannosidazına enzimatik olarak eş-değer olan, bir kısmı;
- (c) (a)'daki veya (b)'deki dizilerin herhangi birine en az %75 dizi özdeşliğine sahip olan ve aynı zamanda rekombinant insan lizozomal alfa-mannosidazına enzimatik olarak eş-değer olan bir amino asit dizisi analogu.

Buluşa göre hücre içine dâhil edilen nükleik asit dizisi ve SEQ ID NO: 1 arasındaki dizi özdeşliğinin derecesinin en az %80, örneğin, en az %85, en az %90, en az %95, en az %97, en az %98 veya en az %99 olması tercih edilebilir.

5

Mevcut bağlamda, rekombinant insan lizozomal alfa-mannosidazına enzimatik olarak eş-değer olan bir amino asit dizisi analogu veya bir amino asit dizisinin bir kısmı, en az %90'lık bir saflıkta bulunduğu en az 5 U/mg'lık bir spesifik aktiviteye sahip olan bir polipeptittir. Saflık kolaylıkla, geleneksel teknikler, örneğin, SDS-PAGE, kullanılarak belirlenir. Spesifik aktivite, mevcut başvurunun örnek 2'sinde tarif edildiği üzere bir enzim analizinde belirlenebilir. Özet olarak, saflaştırılmış polipeptit, reaksiyonun 0,4 M glisin/NaOH, pH 10,4, eklenmesi ile durdurulmasından önce uygun bir süre boyunca 37°C'de substrat, p-nitrofenil- α -mannopiranosit ile inkübe edilir. Dönüştürülen sübstratın miktarı, 405 nm'de absorbansın değişimi ile belirlenebilir ($\epsilon=18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

15

Bazı uygulamalarda, lizozomal alfa-mannosidaz, sistemik aktarım için formüle edilir. Sistem aktarım için formülasyonlar, liyofilize edilmiş formülasyonlar veya sulu çözeltiler formunda çeşitli farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcılar, ekspiyanlar veya stabilazörler (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) içerebilir. "Farmasötik olarak kabul edilebilir" taşıyıcılar, ekspiyanlar veya stabilazörler, kullanılan dozajlarda ve konsantrasyonlarda alıcılar için toksik-değildir ve mevcut başvurular için, bunlar ayrıca kan-beyin bariyerinin geçirgenliği üzerinde etkiye sahip olmayan konsantrasyonlarda bulunur. Tamponlar, örneğin, fosfat, sitrat ve diğer organik asitler; askorbik asidi ve metiyonini içeren antioksidanlar; koruyucular (örneğin, oktadesildimetilbenil amonyum klorür; hekzametonyum klorür; benzalkonyum klorür, benzetonyum klorür; fenol, bütıl veya benzil alkol; alkil parabenler, örneğin, metil veya propil paraben; katekol; resorsinol; sikloheksanol; 3-pentanol ve m-kresol); düşük moleküler-ağırlıklı (yaklaşık 10 rezidüden daha az olan) polipeptit; proteinler, örneğin, serum albümin, jelatin veya immünoglobülinler; hidrofilik polimerler, örneğin, polivinilpirrolidon; amino asitler, örneğin, glisin, glutamin, asparajin, histidin, arjinin veya lizin; monosakkaritler, disakkaritler ve glikozu, mannozu veya dekstrinleri içeren diğer karbonhidratlar; şelatlama ajanları, örneğin, EDTA; şekerler, örneğin, sükroz, mannitol, trehaloz veya sorbitol; tuz-oluşturan karşı-iyonlar, örneğin, sodyum; metal kompleksleri (örn., Zn-protein kompleksleri) ve/veya iyonik olmayan sürfaktanlar, örneğin, TWEEN, PLURONICST veya polietilen glikol (PEG), dâhil edilir.

35

Alfa-mannosidozun başarılı terapisi, santral sinir sistemi ve özellikle bu lizozomal enzimlerin beyne girişini engellediğinden kan-beyin bariyeri tarafından neden olunan zorluklara etkili bir şekilde değinmek zorundadır. Kan beyin bariyerinin anatomik bileşeni, fenestrasyonlar olmadan ve sıvı taşınması için bir kaç mikrovillus ve bir kaç vezikül ile sıkı bağlantı yerlerine sahip olan, beyin kapillerleri içindeki eşsiz endotelyal hücrelerden oluşur. Bunun fizyolojik bileşeni kısmen, beyin endotelyumları için enzim olan enzimlerden ve taşıyıcı proteinler vasıtasıyla aktif taşımadan oluşur.

- 10 Kan-beyin bariyerinin ötesinde, ilave bariyerler mevcuttur. Perivasküler boşluklarda, yabancı bileşikler sıkıştırabilen fagositler devriye gezer, dahası, bazal laminanın katmanları, proteinin makro-moleküler elekleri vaskülatür ve santral sinir sistemi parankiması arasında uzanır. Bundan sonra, *glia lamintan*, astroglıyuların ve mikrogliyuların uç ayaklarından yapılan bir kalkan, bir başka fiziksel bariyeri oluşturur.
- 15 Son olarak, endotelyal bariyerin ötesindeki çözünmüş maddeler de, bitişik boşluklar yoluyla bir dışarı doğru yığın sıvı akışına tabidir. Santral sinir sistemi parankimasından interstisyel sıvı kısmen, ventriküler sisteme ve perivasküler boşluklara hareket ve bunu takiben çözünmüş maddeler, burada çözünebilen bileşenlerin kan-dolaşımına geri döndüğü subaraknoid boşluklara taşınır. Böylelikle, elemanların kan dolaşımından
- 20 beyne girişini sınırlandıran ve regüle eden çok sayıda bariyer vardır.

- Kan beyin bariyeri probleminin beyin ilaç hedefleme teknolojisinin geliştirilmesi ile çözülebileceği tasarlanmıştır. Bu teknoloji, terapötik proteinlerin, in vivo kan-beyin bariyerini oluşturan, beyin kapiller endotelyumu içinde lokalize olmuş endojen taşıma sistemleri üzerindeki erişim vasıtasıyla beyne aktarımına dayanır.
- 25

- Aşağıda, santral sinir sistemini hedef almaya veya santral sinir sistemini hedef almaya aracılık etmeye yönelik bir yetisi olan ve/veya kan-beyin bariyeri aktarımını ve/veya hücresel membranları geçiş için vehiküller olarak etki etmeye yönelik bilinen bir yetisi
- 30 olan bileşenlerin sınırlayıcı-olmayan örnekleri verilir.

1) Hücre membranlarını ve/veya BBB'yi geçiş ile hedef hücrelere LAMAN geçişi için vehiküller olarak peptitler ve proteinler:

Hayvanlardaki çok sayıda çalışma, belirli proteinlerin ve/veya peptitlerin BBB'nin geçilmesi için vehiküller olarak etki edebildiğini göstermiştir. Örneğin, insülin fragmanı ile modifiye edilmiş proteinler (Fukuta et al., Phaomacol Res 11: 1681-1688) veya transferrin reseptörü için antikolar (Friden et al., Proc Natl Acad Sci USA 88: 4771-4775), kan-beyin bariyerini geçebilir. Ayrıca, poliaminlere kuplaj ile modifiye edilmiş proteinlerin (Poduslo ve Curran. J Neurochem 66: 1599-1606) de kan-beyin bariyerini geçebildiği bildirilmiştir. Buna ek olarak, peptidomimetik monoklonal antikolar (MAb), endojen BBB transferrin reseptörü (RfR) veya insülin reseptörü (IR) üzerinde taşıma yoluyla in vivo BBB boyunca reseptör-aracılı transsitoz (RMT) geçirir. Terapötik proteinler, avidin-biyotin teknolojisi ile veya füzyon proteinler olarak MAb taşıma vektörlerine konjuge edilebilir.

2) Hücre membranlarını ve/veya BBB'yi geçiş ile hedef hücelere LAMAN geçişi için vehiküller olarak toksinler:

Farklı bakteriler, bitkiler ve hayvanlar toksinler üretir. Toksinler, çok sayıda farklı hedefe, örneğin, gut (neterotoksinler), sinirler veya sinapslar (nörotoksinler), sahiptir. Toksinler, reseptör aracılı prosesler yoluyla hücre membranlarının içinden geçebilir ve mevcut buluşun uygulanması, hücresel membranları ve/veya BBB'yi geçiş ile hedef hücelere rhLAMAN geçişi için vehiküller olarak toksin kullanmaktır. Tercih edilen hedef hücreler, SSS ve/veya periferik sinir sistemi içindeki hücrelerdir. Toksinin yalnızca, hücresel membranlar ile ilişkiden ve hücresel membranlardan translokasyondan sorumlu olan parçasının kullanıldığı anlaşılabacaktır.

Bir vehikül olarak kullanılan bir toksinin bir örneği, bir bakteriyel toksindir, örneğin, *Corynebacterium Diphtheriae*'den, Difteri Toksini'dir (DT). Bakteriyel toksinler, geniş aralıkta toksisiteler gösterir v bunlar yapı ve fonksiyon açısından gruplara ayrılır. Toksin bir hedef hücreyi bağlar ve bir reseptör vasıtasıyla hücreye girer ve ayrı fragmanlara indirgenir. İşlenmiş toksin, aşağıdaki 3 alana bölünebilir: Katalitik alan (C), reseptör alanı (R) ve translokasyon alanı (T).

Toksinin veya bunun fragmanlarının katalitik fragmanı ve reseptör fragmanı LAMAN ile değiştirilir. Bu füzyon proteini, hücrel membranların ve/veya BBB'nin içinden geçebilir ve böylelikle LAMAN'ı hedef hücrelere aktarabilir. Bir hibrit molekülün mühendisliğinin bir

5 örneği, rekombinant teknolojisi ile olabilir.

Vehiküller olarak kullanılacak olan bakteriyel toksinlerin diğer örnekleri, *Klostridium Botulinum*'dur, *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen *Pseudomonas* Ekzotoksini A'dır, *Vibrio cholerae* tarafından üretilen Kolera Toksini'dir ve *Bordetella pertussis* tarafından üretilen Pertussis

10 Toksini'dir. Vehiküller olarak kullanılan toksinlerin ilave örnekleri, aşağıdaki bitki toksinleri listesinden seçilen bitki toksinleridir: kolinesteraz inhibitörleri, proteaz inhibitörleri, amilaz inhibitörleri, tanninler, siyanojenik glikositler, goitrojenler, lektin proteinleri ve latirojenler, pirrozidin alkaloidleri.

15 Vehikül olarak kullanılan toksinlerin daha ilave örnekleri, kabuklu deniz hayvanlarından (saksitoksin) ve yılanlardan (alfa-bungarotoksin) elde edilen toksinlerdir. Uzmanlığı olan kişi, buluşun detayları ve karakteristikleri ışığında ilave örnekler ekleyebilir.

20 3) Hücre membranlarını ve/veya BBB'yi geçiş ile hedef hücrelere rhLAMAN geçişi için vehiküller olarak bakterilerden veya virüslerden izole edilen proteinler ve peptitler:

25 Bakterilerden veya virüslerinden iş gören eleman ve/veya iş gören protein BBB'yi ve/veya hücrel membranları geçmek için rhLAMAN ile birlikte kullanılabilir.

Bakterilerin örnekleri, aşağıdaki listeden seçilir: *Ns. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *Hemophilus influenzae*, *Staphylococcus* türleri, *Proteus* türleri, *Pseudomonas* türleri, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *M. Tuberculosis*, *Neurospora*, *Iodex ricinus*'tan *Spirochetes* *Borrelia burgdorferi*.

30

Virüslerin örnekleri, virüs familyalarının aşağıdaki listesinden seçilir: *Parvoviridae*, *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Arenaviridae*, *Coronaviridae*, *Retroviridae*, *Bunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* ve

35

Rhabdoviridae. Yukarıda bahsedilen listeden seçilen virüslerin ilgili örnekleri, örn., Kızamık virüsüdür, Papova virüsüdür ve JC virüsüdür.

4) Hücre aracılı aktarım sistemleri

5

Terapiye bir hücre-aracılı yaklaşım, birden fazla temel yolda depolama bozukluklarına değinebilir. Birincisi, kusurlu hücre popülasyonlarını normal eş-değerler ile değiştirmektir veya telafi etmektir. Terapötik yarar elde etmek için bir ikinci yol, çapraz düzeltme yoluyla olabilir. Uygun hücre tipleri, yalnızca kandan endotelyal bariyeri geçme değil aynı zamanda parankima içine aktif bir şekilde göç etme ve hastalıklı hücrelerin milyösü içine yerleşme yetisini de sunar. Tercih edilen insan hücresi, insan monositleri, insan fibroblastları ve insan lenfositleri arasından seçilir.

10

15

5) Kan-Beyin Bariyerini Bozma

Arttırılmış SSS ilaç aktarımı için bir başka invazif strateji, geçici BBB bozulması (BBBD) ile bağlantılı olan ilaçların sistemik uygulamasını içerir. Teorik olarak, zayıflatılmış BBB ile, sistemik olarak uygulanmış ilaçlar, serebral endotelyumda arttırılmış ekstrasvazasyon oranları geçirebilir, bu arttırılmış parankimal ilaç konsantrasyonlarına yol açar. BBB'yi geçici bir şekilde bozan çeşitli teknikler araştırılmaktadır; bununla birlikte, fizyolojik olarak ilginç olmasına rağmen, çoğu kabul edilemez bir şekilde toksiktir ve bundan dolayı klinik olarak kullanışlı değildir. Bunlar, çözücülerin, örneğin, dimetil sülfoksidin veya etanolün ve metallerin, örneğin, alüminyumun, infüzyonunu; X-irradiyasyonunu ve hipertansiyonu, hiperkapniyi, hipoksiyi veya iskemiye içeren patolojik rahatsızlıkların indüksiyonunu içerir.

20

25

30

Bir bir dereceye kadar daha güvenli teknik, konvülsan ilacın, nöbetlere neden olurken BBB geçirgenliğini geçici bir şekilde arttıran, metrazolün, sistemik aktarımını içerir. Anti-konvülsan pentobarbitalin eş-zamanlı uygulaması, BBBD'nin devamlılık göstermesine izin verirken, yakalamayı bloke eder. BBB'den ayrıca, VP-16'yı, sisplatin,

hidroksilüreyi, florourasili ve etoposidi içeren bir kaç anti-neoplastik ajanın sistemik uygulanması ile de taviz verilebilir.

Ozmotik Kan-Beyin Bariyeri Bozulması

5

Bir inert hipertonic çözeltinin, örneğin, mannitolün veya arabinozun, intrakarotid enjeksiyonu, bir kaç saatlik bir periyot boyunca endotelial hücre büzülmesini ve BBB sıkı bağlantı yerlerinin açılmasını başlatmak için kullanılmaktadır ve bu, anti-neoplastik ajanların beyne aktarımına izin verir. Ozmotik bozulma, makro-moleküler ilaçların, 10 örneğin, monoklonal antikorların, nano-parçacıkların ve virüslerin, aktarımı için bir strateji olarak test edilmektedir. Bununla birlikte, prosedür, beyin kendi-savunma mekanizmasını bozar ve bunu dolaşımdaki tüm kimyasallardan veya toksinlerden hasara veya enfeksiyona savunmasız düzeye getirir. Risk faktörleri, plazma proteinlerini geçişini, değiştirilmiş glikoz alımını, ısı şok proteinlerinin ekspresyonunu, 15 mikro-embolizmi veya anormal nöronal fonksiyonu içerir. Böylece, çok fazla sayıda teknik bileşiklerin kan beyin bariyerinden aktarımını kolaylaştırmak için geliştirilmişken, bunların çoğu yukarıda bahsedilen diğer bariyerlere değinmede sınırlı başarı gösterir. Bundan dolayı, alfa-mannosidozun tedavisinde bunların uygulanabilirliğinin sınırlı olduğu görülür.

20

Aksine, bununla birlikte, buluşun çok önemli bir yönü, kan-beyin bariyerini geçerek taşımaya ve/veya kan-beyin bariyerine nüfuz etmeye ve/veya kan-beyin bariyerini bozmaya aracılık etmesi için araçlara bağımlı olmayan bir tekniğe dayanarak santral sinir sistemindeki nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin intra-lizozomal 25 birikmesinin azaltılması için bir şema ile ilgilidir. Buluşun tercih edilen uygulamalarında, bundan dolayı, santral sinir sistemine erişmek için yukarıdaki tarif edilen yaklaşımlar talep edilir. Buluşun tercih edilen bir uygulamalarında, buluşa göre ilaç, santral sinir sistemindeki hücrelerin hedeflenmesine veya hedeflenmesine aracılık etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen ve/veya kan-beyin bariyerini geçiş için vehikül olarak 30 etki etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içermez.

Daha tam terimlerde ifade edilen söz konusu ilaç veya formülasyon, beyin nöronal ve/veya gliyal hücrelerini hedef almaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içermez.

35

Böylelikle, tercih edilen uygulamalar, lizozomal alfa-mannosidazın kullanımı ile ilgilidir, burada söz konusu ilaç santral sinir sistemine/kan beyin bariyerine nüfuz edebilen bir formda lizozomal alfa-mannosidaz içermez. Bu doğrultuda ayrıca, lizozomal alfa-mannosidazın kan-beyin bariyerinden taşıyıcı-aracılı taşıma elde etmek amacıyla modifiye edilmemiş olması ve lizozomal alfa-mannosidazın kan-beyin bariyerinin bozulmasını elde etmek amacıyla formüle edilmemiş olması da tercih edilir.

Eşit olarak tercih edilen uygulamalarda, ilaç bir lizozomal alfa-mannosidaz içerir ve aşağıdakileri içermez

10

- a) lizozomal alfa-mannosidazın santral sinir sistemine aktarımı için bir vehikül veya vektör, örneğin, bir peptit veya polipeptit ve
- b) kan beyin bariyerinin açılmasına veya bozulmasına neden olmaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen ve
- c) bir aynen hücre

15

Daha spesifik olarak, bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa-mannosidazın kullanımını sağlamak mevcut buluşun bir amacıdır, burada söz konusu ilaç, insülin fragmanını ve virüsten veya bakterilerden türetilen peptitleri ve proteinleri içeren ekzojen peptitlerden ve proteinlerden, poliaminlerden, fosfolipitleri içeren lipofilik kısımlardan, antikorlardan veya antikor fragmanlarından, örneğin, transferrin reseptörü antikorlarından ve toksinlerden oluşan gruptan seçilen bir vehikül içermez.

20

Buluş ayrıca, lizozomal alfa mannosidazın kullanımı ile de ilgilidir, burada bir ilacın söz konusu preparasyonu, söz konusu lizozomal alfa-mannosidazın poliaminlerin tutturulması ile modifikasyonunu içermez.

25

Buluşa göre ilaç, bir izotonik çözelti içinde formüle edilen bir lizozomal alfa-mannosidaz içerebilir veya bundan oluşabilir. "İzotonik çözelti" terimi geleneksel olarak, kan ile aynı ozmotik basınca sahip olan bir çözeltiyi ifade eder. Mevcut buluş bağlamında, çözelti bir insan izotonik çözeltisi olabilir, ancak bununla sınırlı değildir. Güncel olarak, 3,10-3,50 mM Na_2HPO_4 , 0,4-0,6 mM NaH_2PO_4 , 25-30 mM Glisin, 220-250 mM Mannitol ve enjeksiyonluk su içeren veya bunlardan oluşan formülasyon tamponları tercih edilir. Eşit olarak, 4,0-5,0 mM Sodyum Sitrat, 0,3-0,8 mM Sitrik Asit, 200-250 mM Mannitol, 3,0-5,0 mM Tween 80 ve enjeksiyonluk su içeren veya bunlardan oluşan formülasyon

30

35

tamponları tercih edilir. Alternatif olarak, lizozomal alfa-mannosidaz, Fosfat tamponlu salin (0,01 M fosfat tamponu + 0,145 M NaCl, pH=7,2) içinde formüle edilebilir.

5 Yukarıda bahsedildiği üzere, aynen hücrelerin kullanımı, kan-beyin bariyerinden maddelerin aktarımı için araçlar sağlayabilir. Bununla birlikte, mevcut buluş bir aynen hücre içermeyen bir ilaç ile ilgilidir.

10 Bu doğrultuda, buluşun bir ilaveten tercih edilen uygulaması, lizozomal alfa-mannosidazın kullanımı ile ilgilidir, burada bir ilacın söz konusu preparasyonu, bir hücre-aracılı aktarım sisteminin kullanımını içermez. Özel olarak, mevcut buluş bir aktarılmış otolog hücreden, örneğin, bir aktarılmış fibroblasttan veya bir periferik kan lenfositinden veya serebrospinal sıvı içine alfa-mannosidaz salgılayabilen polimer ile enkapsüle edilmiş hücre hattından oluşan gruptan seçilen bir aynen hücrenin kullanımına dayanmaz.

15 Lizozomal alfa-mannosidazın uygulanmasının santral sinir sistemindeki çok çeşitli hücrelerde nötral oligosakkaritlerin azaltılmış birikmesi ile sonuçlanacağı beklenecektir. Bununla birlikte, buluşun tercih edilen uygulamalarında, santral sinir sisteminin bir veya birden fazla bölgesindeki söz konusu hücreler, nöronal hücreleri ve/veya gliyal hücreleri 20 içerir. Buna ek olarak, söz konusu hücreler, santral sinir sisteminde bulunan ekstra-nöral hücreler içerebilir.

Beyin, dört majör kısmı, serebrumu, diensefalonu, beyin-kökünü ve serebellumu, içerir. Alfa-mannosidazın uygulanmasının bu kısımların birinde veya birden fazlasında 25 oligosakkaritlerin depolanmasını etkilediği anlaşılabacaktır. Buluşun ilaveten tercih edilen uygulamalarında, santral sinir sistemindeki söz konusu bir veya birden fazla bölge, serebrum, diensefalon, beyin-kökü ve/veya serebellum içinde bir veya birden fazla bölge içerir.

30 Yukarıda-bahsedilen beyin kısımlarının belirli spesifik bölgelerinde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin birikmesindeki düşüşün, alfa-mannosidazın klinik gösterimlerini düşürme açısından özellikle ilgili olması olasıdır. Buluşun daha özel uygulamalarında, oligosakkaritlerin birikmesi, serebrum içindeki, serebral korteks içindeki bir veya birden fazla bölgeyi, subkortikal nükleuslar içindeki bir veya birden

fazla bölgeyi ve limbik sistem içindeki bir veya birden fazla bölgeyi içeren gruptan seçilen bir veya birden fazla bölgede düşürülür.

Çok sayıda duyuşal ve/veya motor fonksiyon, serebral korteks içindeki çeşitli spesifik bölgelere yüklenmiştir. Genel olarak fonksiyon açısından motor olan Frontal Lob içinde, Pre-santral Girus (Primer Motor Korteksi), hassas hareketin kontrolünden sorumludur, Motor İlişkilendirme Korteksi, kompleks hareketler için bilginin entegrasyonundan sorumludur, Konuşma-Motor Korteksi, konuşma üretmeye dâhil edilir; (Broca alanı) ve Pre-Frontal Korteks, karar vermeye; dikkatin yönlendirilmesine dâhil edilir.

10

Genel olarak, fonksiyon açısından duyuşal olan Parietal Lob içinde, Post-santral Girus (Primer Somatosensori Korteks), ciltten (Kütanöz) ve kastan (propriyoseptif) duyunun algılanmasına dâhil edilir, Duyusal İlişkilendirme Korteksi, duyuşal sinyallerin entegrasyonuna, duyuşal dikkatin yönlendirilmesine dâhil edilir; Sol İlişkilendirme Korteksi, dile anlam üretmeye dâhil edilir; (Wernicke alanı) ve Sağ İlişkilendirme Korteksi, uzaysal ilişkilere anlam üretmeye dâhil edilir.

15

Genel olarak fonksiyon açısından duyuşal olan Oksipital Lob içinde, Görme Korteksi, görme duyuşunun algılanmasına dâhil edilir, Görsel İlişkilendirme Korteksi, görsel içeriğin ve anlamın algılanmasına dâhil edilir.

20

Genel olarak fonksiyon açısından duyuşal olan Temporal Lob içinde, Primer Duyma Korteks, duyma duyuşunun algılanmasına dâhil edilir, İşitsel İlişkilendirme Korteksi, işitsel içeriğin ve anlamın algılanmasına dâhil edilir; bu, tat alma ve koklama duyuşunun algılanmasına dâhil edilen parietal korteks Tat Alma ve Koklama Korteksi'ne uzanır, lateral sulkusun derin kısmında yer alan İnsüler Korteks, olayların sonucu hakkında bilgi sağlamaya dâhil edilir.

25

Diğer bölgeler, hipokampüs üstünde yer alan Parahipokampal Girus'u, uzun-sürelî hafızanın oluşmasına dâhil edilen Hipokampüs'ü ve duyuşunun hissedilmesine dâhil edilen Amigdala'yı içerir.

30

Buluşun daha da özel uygulamalarında, oligosakkaritlerin düzeyleri, serebral korteks içindeki, frontal lobu, parietal lobu, temporal lobu ve oksipital lobu içeren gruptan seçilen bir veya birden fazla bölgede düşürülür.

35

Buluşun diğer özel uygulamalarında, oligosakkaritlerin düzeyleri, diensefalon içindeki, talamusu ve hipotalamusu içeren gruptan seçilen bir veya birden fazla bölgede düşürülür.

5

Talamus, beynin merkezi içinde derine gömülmüş diensefalonun bir bileşeniir. Kortikal yapılar ile zengin ve resiprokal bir şekilde bağlanmış, talamik nükleuslar hem beyin boyunca bilgi aktarımını iletme hem de modüle etme işlevi gösterir.

- 10 Talamus, aşağıdaki ana kısımları içerir: anterior nükleer grup, orta-hat nükleer grup, mediyal dorsal nükleus, intra-laminer nükleer grup, lateral nükleer grup, ventral nükleer grup, genikulat cisimler, posterior nükleer kompleks, talamik retiküler nükleus, talamik ağ yolları ve talamusun stratum zonalesi.

- 15 Limbik sistem, çeşitli duygulara, örneğin, agresyona, korkuya, hoşnutluğa ve aynı zamanda hafıza oluşmasına dâhil edilen beyin yapılarının bir grubudur. Limbik sistem ayrıca, endokrin sistemi ve otonomik sinir sistemini de etkiler. Bu, serebrumun hemen altında, talamus etrafında yer alan bir kaç yapıdan oluşur: Uzun-sürelili hafızanın oluşmasına dâhil edilen hipokampus, agresyona ve korkuya dâhil edilen amigdala, 20 singulat girus, fornikat girus, arkikorteks ve otonomik sinir sistemini kontrol eden ve kan basıncını, kalp ritmini, açlığı, susamayı ve cinsel uyarıyı regüle eden hipotalamus. Pituitör bez ile bağlantılıdır ve bundan dolayı endokrin sistemi regüle eder.

- 25 Beyin-kökünde yer alan nörolojik fonksiyonlar, sağ kalım için (nefes alma, sindirim, kalp ritmi, kan basıncı) ve uyarı için (uyanık ve tetikte olma) gerekli olanları içerir. Kranial sinirlerin çoğu, beyin-kökünden gelir. Beyin-kökü, periferik sinirlerden ve omurilikten beynin en yüksek kısımlarına yukarıya ve aşağıya doğru geçen tüm ağ yolları için yoldur. Buluşun ilave özel uygulamalarında, oligosakkaritlerin düzeyleri, beyin-kökü içindeki, orta-beyni, ponsu ve medulla oblongatayı içeren gruptan seçilen bir veya 30 birden fazla bölgede düşürülür.

- Medulla oblongata primer olarak, omurilik ve beyin arasındaki motor yollarının çaprazlanması için bir aktarma istasyonu olarak işlev gösterir. Bu ayrıca, respiratuvar, vazomotor ve kardiyak merkezleri aynı zamanda refleks aktivitelerini, örneğin, 35 öksürmeyi, öğürmeyi, yutmayı ve kusmayı, kontrol etmek için çok sayıda mekanizmayı

da içerir. Orta-beyin, serebral yarı-kürelerin sinir yolu görevi görür ve işitsel ve görme refleksi merkezlerini içerir. Pons, beyin farklı kısımlarını bağlayan ve medulladan beyin daha yüksek kortikal yapılarına bir aktarma istasyonu görevi gören bir köprü-benzeri yapıdır. Bu, respiratuvar merkezi içerir.

5

Serebellar korteksi içeren serebellumun fonksiyonu, katılan çeşitli kas gruplarının eylemini koordine etme ile hareketlerin performansını kolaylaştırmaktır. Buluşun diğer özel uygulamalarında, oligosakkaritlerin düzeyleri, serebellum içindeki, serebellar korteksi içeren, bir veya birden fazla bölgede düşürülür.

10

Mevcut buluşa göre rekombinant lizozomal alfa-mannosidaz kullanımının bir primer avantajı, tedavinin beyinde görülen etkilerinin santral sinir sisteminin parçası olmayan hücrelerdeki etkiler ile birleştirilebileceği gerçeği ile ilgilidir. Böylelikle, ekzojen lizozomal alfa-mannosidazın uygulanması büyük olasılıkla, alfa-mannosidozun klinik gösterimlerinin tümünü olmasa da çoğunu düzeltir. Tercih edilen uygulamalarda, Buluş böylelikle, santral sinir sisteminin içinde olmayan nörolojik dokuların hücrelerinde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin düzeylerini ilaveten düşüren bir ilacın kullanımı ile ilgilidir. Buluşun bu uygulamasında, söz konusu ilaç ilaveten, santral sinir sisteminin içinde olmayan nörolojik dokuların hücrelerini hedef alabilen bir bileşen içerir. Özel olarak, bu ilacın kullanılması, santral sinir sisteminin içinde olmayan, periferik sinir sisteminin en önde gelen hücrelerini içeren hücrelerde lizozomal depolamanın düzeltilmesi ile sonuçlanır. Bunlar, nöronal hücreleri ve/veya Schwann hücrelerini içerir.

20

25

Alfa-mannosidozun klinik gösterimleri kısmen, viseral dokularda kusurlu alfa-mannosidazı değiştirmenin izole edilmiş etkileri ile hafifletilebilir. Bununla birlikte, mevcut buluşun temelini oluşturan, kavramın merkezi bir parçası, terapinin santral sinir sisteminde lizozomal depolama üzerindeki yararlı etkilerinin santral sinir sistemi dışındaki dokularda lizozomal depolamada bir düşüşe sekonder olduğu ve/veya bu düşüşe bağlı olduğu gerçeği ile ilgilidir. Bu doğrultuda, söz konusu ilacın ayrıca, nörolojik-olmayan dokulardaki hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin düzeylerinde bir düşüş elde etmek amacıyla da kullanılması ve ilacın bu tarz dokular içindeki hücreleri hedef alabilen bir bileşen içermesi buluşun önemli bir karakteristiğidir.

30

35

Bu bağlamda, viseral dokularda ekzojen alfa-mannosidazın etkilerinin primer önemlilikte olduğuna inanılır. Bundan dolayı, buluşun tercih edilen bir uygulamasına göre, ilaç santral sinir sisteminin dışındaki nörolojik ve/veya nörolojik-olmayan dokuların hücrelerini hedef alabilen bir bileşen içerir. Daha da tercih edilen bir uygulamada, santral sinir sisteminin dışındaki söz konusu nörolojik ve/veya nörolojik-olmayan dokular, karaciğeri, dalağı, böbreği ve kalbi içeren gruptan seçilen viseral dokuları içerir.

Ekzojen alfa-mannosidazın, örneğin, reseptör aracılı endositoz kullanılması ile santral sinir sistemi dışındaki ilgili dokularda hücreleri hedef almak için aktarılabileceği gösterilir. Tercihen, alfa-mannosidaz, bir mannoz- veya mannoz-P-6-reseptörü-aracılı alım avantajını elde ederek bu tarz hedef hücrelerin hücrel membranları üzerinden uygulanır. Bu doğrultuda, hedef alma yetilerine sahip olan yukarıda bahsedilen faktör tercihen, mannoz-6-fosfattır.

Herhangi bir memeli alfa-mannosidazının bir süjude kusurlu enzimi değiştirmek için kullanılabileceği düşünülür. Bununla birlikte, süje bir insan olduğunda, bir insan lizozomal alfa-mannosidazının kullanımı, örneğin, antijenik reaksiyonların meydana gelmesini minimuma indirmek, amacıyla tercih edilecektir. Bu doğrultuda, buluşun tercih edilen uygulamaları, bir insan lizozomal alfa-mannosidazı olan bir lizozomal alfa mannosidazın kullanımı ile ilgilidir.

En çok tercih edilen bir uygulamada, lizozomal alfa-mannosidaz, SEQ ID NO: 1 amino asit dizisini içerir.

Pratik ve ekonomik nedenlerden dolayı, alfa-mannosidazın rekombinant olarak üretilmesi tercih edilir. Dahası, dokudan saflaştırılmış bir lizozomal hidrolaz için, enzimin bir düşük mannoz-6-fosfat içeriğine sahip olması beklenecektir. Böylelikle, rekombinant üretim ile, enzimin, burada büyük bir fraksiyonun mannoz-6-fosfat içerdiği, bir preparasyonunu elde etmek de mümkün olacaktır. Rekombinant üretim, bir hücrenin SEQ ID NO: 2 dizisini içeren bir nükleik asit dizisini kullanarak transfeksiyonundan sonra başarılabilir.

Alfa-mannosidaz tercihen, örneğin, vücudun viseral organlarının, hücrelerinde etkili reseptör aracılı alımı garanti eden bir glikosilasyon profili sağlamak amacıyla bir

memeli hücreleri sisteminde yapılır. Özel olarak, CHO, COS veya BHK hücrelerinde enzimin üretilmesinin mannoz-6-fosfat rezidülerinin eklenmesi ile enzimin yeterli post-translasyonel modifikasyonunu garanti ettiği bulunmuştur. Buna ek olarak, bir doğru siyalilasyon profili elde edilir. Doğru siyalilasyonun, ağıdaki galaktoz rezidülerinden dolayı, karaciğer tarafından alımı önlemek amacıyla önemli olduğu bilinir.

Bundan dolayı, daha çok tercih edilen uygulamalarda, memeli hücreleri sistemi, CHO, COS hücrelerini veya BHK hücrelerini içeren gruptan seçilir (Stein et al., J Biol Chem.1989, 264, 1252-1259). Memeli hücreleri sisteminin bir insan fibroblast hücre hattı olması ilaveten tercih edilebilir.

En çok tercih edilen bir uygulamada, memeli hücreleri sistemi, bir CHO hücre hattıdır.

Bundan, buluşun eşit olarak tercih edilen uygulamalarının, lizozomal alfa-mannosidazın, burada söz konusu preparasyonun bir fraksiyonunun mannoz-6-fosfat grupları taşıyan bir veya birden fazla N-bağılı oligosakkaride sahip olan lizozomal alfa mannosidazdan oluştuğu, bir preparasyonunun kullanımı ile ilgili olduğu sonucu çıkar.

Söz konusu lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunun bir fraksiyonunun mannoz-6-fosfat reseptörlerini bağlayabilmesi ilaveten tercih edilir.

Enzimin mannoz-6-fosfat reseptörlerini bağlama yetisi, mevcut başvurunun örnek 1'inde tarif edildiği şekilde bir in vitro analiz ile belirlenebilir. Burada, enzimin bir MPR afinite 300 Matrix'sini bağlaması, bunun mannoz-6-fosfat reseptörlerini bağlama yetisinin bir ölçüsünü sağlar. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, enzimin mannoz-6-fosfat reseptörlerini bağlaması, in vitro gerçekleşir.

Buluşun daha çok tercih edilen uygulamalarında, bu fraksiyon, lizozomal alfa-mannosidazın bir preparasyonunun aktivitesinin %1'i ile 75'ine, örneğin, %2'si ile 70'ine, örneğin, %5'i ile 60'ına, örneğin, %10'u ile 50'sine, örneğin, %15'i ile 45'ine, örneğin, %20'si ile 40'ına, örneğin, %30'u ile 35'ine, karşılık gelir.

Bu doğrultuda, lizozomal alfa-mannosidazın, mannoz 6-fosfat rezidülerinin, enzimin miktarının %2'si ile 100'ünün, %5'i ile 95'inin, %10'u ile 90'ının, %20'si ile 80'inin, %30'u ile 70'inin veya %40'ı ile 60'ının bir Man-6-P-reseptörü matriksini mannoz 6-fosfat

bağımlı bağlamasına izin veren bir içeriğine sahip olması tercih edilir. Bu durumda, fosforilasyon derecesi, enzimin bir kaç serisinde analiz edilmiştir ve tipik olarak enzimin %30'u ila 45'i, fosforile edilir ve afinite matriksini bağlar.

- 5 Söz konusu lizozomal alfa-mannosidazın %2-100'ünden, %5-90'ından, %10-80'inden, %20-75'inden, %30-70'inden, %35-65'inden veya %40-60'ından oluşan bir fraksiyonun Man-6-P-reseptörünü yüksek afinite ile bağlaması ilaveten tercih edilir. Teorik olarak, iki mannoz 6-fosfat grubunun, enzimin bir Man-6-P-reseptörünü yüksek afinite ile bağlaması için birbirine yakın konumlandırılması gerekir. Yakın tarihli gözlemler, 10 fosforile edilmiş mannoz rezidüleri arasındaki mesafenin, yüksek afiniteli bağlama elde etmek için 40 Å veya daha az olması gerektiğini öne sürer. SEQ ID NO: 1'e göre insan lizozomal alfa-mannosidazında, iki mannoz 6-fosfat rezidüsü, pozisyonlar 367'de ve 766'da asparajin rezidülerinde konumlandırılabilir. Bu doğrultuda, mevcut buluşa göre ilacın, bir fraksiyonunun bu asparajin rezidülerinin her ikisinde mannoz 6-fosfat grupları 15 taşıyan lizozomal alfa-mannosidaz içermesi tercih edilir.

- Çeşitli farklı uygulama araçlarının enzimi aktarmak için kullanılabileceği anlaşılabacaktır. Bunlar, intravenöz, intra-arteriyel, subkütan, intraperitoneal veya intramüsküler enjeksiyonu veya infüzyonu içeren parenteral yolları içerir. Uygulamanın düzenli bir 20 temelde tekrar edilmesi olası olduğundan, uygulama için basit tekniklerin kullanılması tercih edilir. Buluşun bir güncel olarak en çok tercih edilen uygulamasında, alfa mannosidaz, intravenöz uygulama için olan bir ilacın preparasyonu için kullanılır. Özel olarak, bu yol vasıtasıyla uygulama bir yatan-hasta tarafından gerçekleştirilemeyeceğinden, santral sinir sistemine doğrudan enjeksiyon ile 25 uygulamanın uygun olmadığı düşünülür.

- Buluşa göre alfa-mannosidazın kullanılması ile hazırlanan ilacı santral sinir sistemini hedef almaya veya hedef almaya aracılık etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içeren bir bileşim ile birlikte-uygulaması elbette mümkün olacaktır. Mevcut 30 buluşun daha çok-tercih edilen bir uygulamasında, bu tarz birlikte-uygulama gerekli de değildir arzu da edilmez ve tedavi şemasına dâhil edilmeyecektir. Bu uygulama, buluşa göre kullanım ile ilgilidir, burada söz konusu ilaç, santral sinir sistemini hedef almaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içeren bir bileşimin takviye uygulaması olmadan uygulama içindir.

İlacın dozlar hâlinde uygulanacağı görülür, burada lizozomal alfa-mannosidazın miktarı, lizozomal depolamadaki kusurları düzeltmek için yeterlidir. İlgili lizozomal bozukluklar hakkındaki önceki çalışmalardan, kusurlu enzimin bir tam sübstitüsyonunun, böylece sağlıklı bireylerde görülenlere karşılık gelen düzeylere ulaşılmasının, gerekli olmayabileceği görülür. Terapinin maliyetini minimuma indirmek ve büyük olasılıkla ayrıca varsayımsal advers etkileri de azaltmak için, amaç mümkün olduğu kadar küçük miktarlarda enzim kullanmak olmalıdır. Buna ek olarak, münferit süjenin profiline göre uygulanan miktarları ve uygulama sıklığını içeren tedaviyi "uygun hâle getirmenin" mümkün olduğu görülür. Böylelikle, mevcut buluşun tercih edilen uygulamalarında, ilaç, tedavi edilecek olan süjenin vücut ağırlığının her bir gramı için 1 ila 400 mU lizozomal alfa-mannosidaz aralığı içinde olan, örneğin, vücut ağırlığının her bir gramı için 2 ila 350, 5 ila 300, 7,5 ila 200, 10 ila 200, 15 ila 150, 20 ila 100, 25 ila 75, 30 ila 60, 35 ila 50 veya 40 ila 45 mU lizozomal alfa-mannosidaz aralığı içinde olan, bir miktarda uygulanır.

Buluşun bir güncel olarak daha çok tercih edilen uygulamasında, ilaç, vücut ağırlığının her bir gramı için 250 mU lizozomal alfa-mannosidaz olan bir miktarda uygulanır. Buluşun bir eşit olarak tercih edilen uygulamasında, ilaç, vücut ağırlığının her bir gramı için 50 mU lizozomal alfa-mannosidaz olan bir miktarda uygulanır.

Lizozomal alfa-mannosidazın spesifik aktivitesi, yetisini etkileyen bir elzem faktör olabilir, burada söz konusu lizozomal alfa-mannosidaz, 5 - 100 U/mg, örneğin, 10 - 90 U/mg, 15 - 80 U/mg, 20 - 70 U/mg, 25 - 65 U/mg, 30 - 60 U/mg veya 35 - 55 U/mg olan bir spesifik aktiviteye sahiptir.

Mevcut buluşta kullanılan enzim preparasyonunda, lizozomal alfa-mannosidazın miktarının bir fraksiyonu, SEQ ID NO: 1'e en az %75, %80, %85, %90, %95, %97, %98 veya %99 dizi özdeşliğine sahip olan bir amino asit dizisinin 130 kDa'luk monomerlerinden oluşan bir 260 kDa'luk dimer formunda bulunur. Bununla birlikte, indirgeme koşulları altında analiz edildiğinde, enzimin miktarının bir değişken fraksiyonunun, 70 ve 55 kDa'luk formlara işlenmiş olduğu görülür. Bu, lizozomal alfa-mannosidazın miktarının bir fraksiyonunun kısmen yarılmış olduğunu, ancak disülfid köprüleri vasıtasıyla hâlâ 260 kDa'luk formda birlikte tutulduğunu gösterir. Hem 130 kDa'luk form hem de işlenmiş formlar aktiftir, ancak süjeye uygulandığında, enzimin miktarının büyük bir fraksiyonunun, 130 kDa'luk öncül formda dimerler olarak

bulunması tercih edilir. Tercihen, en az %30'u, %35'i, %40'ı, %45'i, %50'si, %55'i, %60'ı, %65'i, %70'i, %75'i, %80'i, %85'i, %90'ı, %95'i veya %100'ü, 130 kDa'luk formda bir dimer olarak bulunur. Enzim bunu takiben lizozomlar içine alındığında, bu 15, 42 ve 70 kDa'luk peptidlere işlenir. 70 kDa'luk peptit, disülfid köprüleri vasıtasıyla hâlâ birlikte tutulan daha küçük üç peptide işlenir.

Enzim replasman terapisinin yalnızca geçici etkiler üretmesi beklendiğinden, ilacın bir kaç günlük enjeksiyon ile haftada veya ayda bir kere veya iki kere aralığındaki bir sıklıkta uygulanabilir olması ilaveten görülür. Tercih edilen uygulamalarda, ilaç 1 ila 5 günlük enjeksiyonlara, 1 ila 5 haftalık enjeksiyonlara, 2 hafta bir 1 ila 5 enjeksiyona veya ayda bir 1 ila 5 enjeksiyonla karşılık gelen bir sıklıkta uygulanabilir. Alternatif olarak, sıklık, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14 günde bir enjeksiyona karşılık gelebilir.

Eşit olarak tercih edilen uygulamalarda, ilaç bir günlük temelde tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile, 2, 3, 4, 5 veya 6 günde bir tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile veya bir haftalık, iki-haftalık veya aylık temelde tekrarlı intravenöz enjeksiyon ile uygulanır.

Buluşun bir güncel olarak tercih edilen uygulamasında, lizozomal alfa-mannosidazın miktarı, 3 ila 4 günde bir kere uygulanır.

Mevcut buluşa göre ilacın intravenöz enjeksiyon ile uygulanması yalnızca, santral sinir sistemi içinde bulunan lizozomal alfa-mannosidazın miktarında anlamsız artışlara yol açar. Bu teori ile sınırlandırılmadan, nötral oligosakkaritlerin azaltılmış düzeylerinin, periferik dokuda ve viseral organlarda enzimin arttırılmış düzeylerine sekonder olabildiği ve bunun bir doğrudan veya dolaylı sonucu olabildiği görülür. Lizozomal alfa-mannosidazın dolaşımdan çabuk bir şekilde temizlendiği görüldüğünden, enzimin uygulanan miktarının, dolaşımdaki enzimin düzeylerinin Man-6-P reseptörü vasıtasıyla veya büyük olasılıkla ayrıca başka güncel olarak bilinmeyen taşıma mekanizmaları yoluyla enzimin uygun miktarlarının hücre alımına izin veren bir süre boyunca yeterli bir şekilde arttırılmış olarak kalacağı şekilde olması kritik görülür. Buna ek olarak, viseral organlar ve periferik doku içinde enzimin düzeyleri, yalnızca organların veya dokunun içinde değil aynı zamanda santral sinir sisteminin içinde de nötral sülfatitlerde bir düşüşe neden olmak için yeterli bir süre boyunca yeterli bir şekilde arttırılmış olarak kalmalıdır. Bu doğrultuda, lizozomal alfa-mannosidazın uygulanan miktarının, söz

konusu ilacın enjeksiyonunu, örneğin, intravenöz enjeksiyonunu, takiben, aşağıdaki şekilde olması tercih edilir:

- 5 a) enzimin etkili düzeyleri, en az 5-30 dakika, örneğin, en az 5, 10, 15, 20, 25 veya 30 dakika, boyunca dolaşımda sürdürülür ve/veya
- b) enzimin etkili düzeyleri, böbreği, dalağı ve kalbi içeren viseral organlarda, en az 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 veya 24 saat boyunca sürdürülür ve/veya
- c) enzimin etkili düzeyleri, karaciğerde en az 6, 12 veya 24 saat veya 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veya 10 gün boyunca sürdürülür.

10

Mevcut bağlamda, "etkili düzeyler" terimi, lizozomal alfa-mannosidazın, mevcut başvurunun örnek 2'sinde tarif edildiği şekilde bir enzim analizinde analiz edildiğinde tedavi edilmemiş süjelerden elde edilen serumda veya organ ekstraktlarında görülen enzim düzeyleri ile karşılaştırıldığında en az iki kat, en az 5 kat, en az 10 kat, en az 20

15

Tercihen, söz konusu süjeye uygulanan enzim, intra-lizozomal oligosakkaritlerin düzeylerinde tercihen %20'ye, daha tercihen %30'a, hatta daha tercihen %40'a, hatta daha da tercihen %50'ye, daha da tercihen %60'a, en tercihen %70'ten fazlasına

20

Özel olarak, lizozomal alfa-mannosidazın uygulanan miktarı, söz konusu ilacın enjeksiyonunu, örneğin, intravenöz enjeksiyonunu, takiben, tercihen aşağıdaki şekildedir:

25

- a) karaciğeri, dalağı, böbreği ve/veya kalbi içeren viseral organlarda nötral oligosakkaritlerin miktarı, tedaviden önceki düzeyler veya tedavi edilmemiş süjelerde görülen düzeyler ile karşılaştırıldığında, 2, 4, 6, 8, 10, 12 18 veya 24 saat boyunca %10-80, %15-85, %20-90, %25-95 veya %30-100, örneğin, en az
- 30 %10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 veya 95, azaltılır ve/veya
- b) b) karaciğeri, dalağı, böbreği ve/veya kalbi içeren viseral organlarda nötral oligosakkaritlerin miktarı, 1 - 4, 2 - 6 veya 4 - 8 günlük bir periyot boyunca %40-80, %45-85, %50-90, %55-95 veya %60-100, örneğin, en az %40, 45, 50, 55,
- 35 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 veya 95, azaltılır ve/veya

- c) c) karaciğerde nötral oligosakkaritlerin depolanması, sinüs endotelyal hücreleri, Kupffer hücreleri ve hepatositler içinde depolama kofullarının bir azaltılmış varlığı ile belirlendiği üzere, 1 ila 12, 2 - 10 veya 4 - 8 günlük bir periyot boyunca azaltılır.

5

Mevcut buluşun merkezi, santral sinir sisteminde nötral oligosakkaritlerin düzeylerindeki bir düşüşün yalnızca, lizozomal alfa-mannosidazın tekrarlı uygulamasından sonra görüldüğü gözlemidir. Bundan dolayı, lizozomal alfa-mannosidazın uygulanan miktarının, bir günlük temelde ilacın tekrarlı enjeksiyonu, 10 örneğin, intravenöz enjeksiyonu ile, 2, 3, 4, 5 veya 6 günde bir tekrarlı enjeksiyon, örneğin, intravenöz enjeksiyon ile veya bir haftalık, iki-haftalık veya aylık temelde tekrarlı enjeksiyon, örneğin, intravenöz enjeksiyon ile, aşağıdaki şekilde olması tercih edilebilir:

15

- a) enzimin etkili düzeyleri, dolaşımda sürdürülür ve/veya
b) enzimin etkili düzeyleri, böbreği, dalağı ve kalbi içeren viseral organlarda sürdürülür ve/veya
c) enzimin etkili düzeyleri, karaciğerde sürdürülür.

20

Lizozomal alfa-mannosidazın uygulanan miktarının, bir günlük temelde ilacın tekrarlı enjeksiyonu, örneğin, intravenöz enjeksiyonu ile, 2, 3, 4, 5 veya 6 günde bir tekrarlı enjeksiyon, örneğin, intravenöz enjeksiyon ile veya bir haftalık, iki-haftalık veya aylık temelde tekrarlı enjeksiyon, örneğin, intravenöz enjeksiyon ile, aşağıdaki şekilde olması eşit şekilde tercih edilebilir:

25

- a) böbrekte ve kalpte nötral oligosakkaritlerin depolanması tam olarak düzeltilir veya en azından 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14 günlük bir periyot boyunca tam olarak düzeltilir ve/veya

30

- b) dalakta nötral oligosakkaritlerin miktarı en az %10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 veya 100 azaltılır veya böylece en azından 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14 günlük bir periyot boyunca azaltılır ve/veya
c) karaciğerde ve böbrekte nötral oligosakkaritlerin depolanması, karaciğerin sinüs endotelyal hücrelerinde, Kupffer hücrelerinde ve hepatositlerinde ve böbreğin tübüler epitelyumlarında depolama kofullarının bir azaltılmış varlığı ile belirlendiği

üzere azaltılır veya 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 veya 14 günlük bir periyot boyunca azaltılır.

5 Beyinde depolanmış oligosakkaritlerin azaltılması, en azından kısmen, beyin endotelyumlarından ve meninkslerden depolama materyalinin klirensi ile sonuçlanabilir, bu küçük kan dolaşımını ve serebrospinal sıvının akışını iyileştirebilir. Böylelikle, mevcut buluşun daha çok tercih edilen bir uygulaması, beyin endotelyumlarının ve/veya meninkslerin bir veya birden fazla bölgesindeki hücrelerde nötral mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin intraselüler düzeylerini düşürmek amacıyla bir ilacın preparasyonu için lizozomal alfa-manosidazın kullanımı ile ilgilidir.

İlacın yukarıda tarif edilen karakteristiklere sahip olabildiği anlaşılabacaktır. Böylelikle, buluşun bu yönünün tercih edilen bir uygulamasında, söz konusu ilaç, santral sinir sisteminin hedef almaya veya santral sinir sisteminin hedef alınmasına aracılık etmeye 15 yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen ve/veya kan-beyin bariyerini geçiş için bir vehikül olarak etki etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içermez.

Yine, yöntemin alfa-mannosidazın söz konusu ilacını intraserebroventriküler, spinal, intratekal veya intrakraniyal uygulama dışındaki bir yol ile uygulamayı içerir.

20 İlacın intravenöz veya subkütan enjeksiyon ile uygulanması özel olarak tercih edilir.

Mevcut buluşa göre ilacın santral sinir sisteminin hedef almaya veya santral sinir sisteminin hedef alınmasına aracılık etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen 25 ve/veya kan-beyin bariyerini geçiş için bir vehikül olarak etki etmeye yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen ile birlikte-uygulanması ne gereklidir ne de arzu edilebilir ve tedavi şemasına dâhil edilmez. Böylelikle, söz konusu ilacın uygulanmasının santral sinir sisteminin hedef almaya yönelik bilinen bir yetisi olan bir bileşen içeren bir bileşimin uygulanması ile takviye edilmemesi tercih edilir.

30 Yakın tarihli bir yayına göre, rekombinant insan alfa-L-idüronidazın (rhIDU) intratekal enjeksiyonu, serebrospinal sıvının içine doğrudan enjeksiyon, mukopolisakkaridozun (MPL) bir kanin modelindeki beyin dokusunda karbonhidrat depolanmasını azaltabilir (Kakkis, 2003). Mevcut buluşa göre ilacın intravenöz uygulanması ziyadesiyle tercih

edilirken, Kakkis'in gözlemleri, bu tarz uygulamanın en azından bazı olgularda, diğer uygulama yollarını içeren, diğer tedaviler ile birleştirilebileceğini öne sürer.

5 Böylelikle, buluş, intravenöz uygulama amacıyla aynı zamanda intratekal veya spinal enjeksiyon ile uygulama amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozomal alfa mannosidazın kullanımını sağlayabilir, burada birleştirilmiş intravenöz ve intratekal uygulama, bir süjede periferik sinir sistemindeki hedef hücrelerde ve santral sinir sistemindeki hedef hücrelerde galaktosil sülfatit düzeylerinde bir düşüş ile sonuçlanır.

10 İlaveten, buluş intravenöz uygulama amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir lizozozmal alfa-mannosidazın kullanımını sağlayabilir, burada ilacın intravenöz uygulanması, periferik sinir sistemindeki hedef hücrelerde ve santral sinir sistemindeki hedef hücrelerde galaktosil sülfatit düzeylerinde bir düşüş ile sonuçlanır.

15 Daha başka bir yönünde, rekombinant insan alfa-mannosidazının preparasyonu için bir yöntem sağlanır, yöntem a) uygun bir vektör içine SEQ ID NO: 1'de gösterilen amino asit dizisini kodlayan bir DNA fragmanını içeren bir nükleik asit fragmanını uygulamayı; b) bir hücreyi adım a)'da elde edilen vektör ile transforme etmeyi; c) transforme edilmiş konak hücreyi nükleik asit dizisinin ekspresyonunu kolaylaştıran koşullar altında
20 kültürlemeyi; d) kültürden ekspresyon ürününü geri-kazanmayı içerir. Yöntem ilaveten, bir dizi bir veya birden fazla saflaştırma adımını içerebilir.

Özel olarak, burada nükleik asit fragmanının SEQ ID NO: 2'de gösterilen DNA fragmanının 3066 baz-çifti EcoRI - XbaI fragmanını içerdiği bir yöntem sağlanır.

25

Mannoz-6-P olan rekombinant alfa-mannosidazın üretilmesi, aşağıdaki genel adımların (genel hatları gösterilen bir taslağın) birini veya bir kaçını veya tümünü içerir:

A. rhLAMAN'ın sentezi

30

Spesifik rhLAMAN'ın klonlanması

B. Transfeksiyon

2-10 µg rhLAMAN hibrit vektör DNA'sı, memeli hücrelerine (örn., CHO, COS hücrelerine veya BHK hücrelerine) fosfat çökeltme/glisero1 şok metodolojisi ile transfeksiyon için kullanılır. Transfeksiyon ayrıca, bir elektrik şok metodolojisi ile de yapılabilir.

5

C. rhLAMAN'ın ekspresyonu

Aktif proteinin sentezi ve söz konusu proteininin mannoz-6-P modifikasyonu memeli hücresi sisteminde ekspresyon sırasında yapılır.

10

D. rhLAMAN'ın saflaştırılması

Rekombinant insan alfa-mannosidazı, bir 6 adımlı prosedür kullanılarak saflaştırılır - bakınız örnek 1.

15

E. Mannoz-6-P reseptörü aracılı alım için test sistemi

Üretilen rekombinant alfa-mannosidazın bir mannoz-6-P reseptörü aracılı alımda aktif olma yetisi, alfa-mannosidazı normal Fibroblastlar veya alfa-mannosidoz hastalarından elde edilen Fibroblastlar ile inkübe etme ile test edilir. Hücrelere alım, artırılmış alfa-mannosidaz aktivitesi ile analiz edilir.

20

Güncel olarak tercih edilen bir uygulamada, alfa-mannosidaz BHK, COS ve CHO hücrelerinden oluşan gruptan seçilen bir memeli hücresi sisteminde üretilir. Yöntemin kritik parametrelerinden biri, nihai preparasyonda alfa-mannosidazın glikosilasyon profilidir. Glikosilasyon profili, bunun reseptör aracılı endositoz üzerindeki etkileri ve enzimin kan dolaşımından klirensi vasıtasıyla enzimin in vivo düzeltici aktivitesinin majör bir belirleyicisidir. Yukarıda bahsedilen tercih edilen memeli hücresi sistemleri kullanıldığında, uygun bir glikosilasyon profili olan alfa-mannosidazın üretildiği bulunmuştur; özellikle CHO hücrelerinin kullanılması, bir yeterli mannoz-6-fosfat içeriği olan alfa-mannosidazın üretilmesine yol açar. Mevcut başvurunun örneklerinde, alfa-mannosidazın bir MPR 300 kolonunu bağlama yetisi, bunun mannoz-6-fosfat içeriğinin bir ölçüsünü sağlar. Mannoz-6-fosfat içeren alfa-mannosidaz, vasat içine salgılanır ve enzimin saflaştırılması fermentasyon adımımda amonyum tuzlarının (NH₄Cl) kullanılması ile kolaylaştırılabilir.

25

30

35

Güncel olarak, enzimi izole ederken ve saflaştırırken hesaba katılması gereken, bir faktör izolasyon sırasında defosforilasyonun meydana gelmesidir. Burada enzim aktivitesinin %40'ına veya daha fazlasına karşılık gelen bir fraksiyonun MRP 300

5 kolonunu bağlayabildiği, insan alfa-mannosidazının preparasyonu elde edilirken, bu fraksiyon yüzde bir kaç kadar düşük olabilir. İşleme prosesleri sırasında defosforilasyonu azaltmak için, bir veya birden fazla fosfataz inhibitörünün varlığının elzem olduğu görülür. Bu tarz fosfataz inhibitörlerine, ticari kaynaklardan erişilebilir.

- 10 Buluşun önemli bir yönü, alfa-mannosidozun tedavisi amacıyla bir ilacın preparasyonu için bir rekombinant alfa-mannosidazın kullanımı ile ilgilidir. Özel olarak, alfa-mannosidazın bir rekombinant insan alfa-mannosidazı olması tercih edilir.

- 15 Buluşa ait yöntem için hedef olan hastalık, alfa-mannosidozdur ve bundan dolayı, katalizör, alfa-mannosidazdır veya bunun bir enzimatik olarak eş-değer parçasıdır veya analogudur. Enzimin bir natif kaynaktan saflaştırılması gerekeceğinde, rekombinant üretim, mevcut güncel araçlar ile, uygulanabilir görünmeyen büyük-ölçekte üretime olarak sağlayacağından, katalizörün insan alfa-mannosidaz enziminin veya bunun enzimatik olarak eş-değer parçasının veya analogunun bir rekombinant formu olması
- 20 en çok tercih edilir.

- Tercihen, alfa-mannosidaz, rekombinant teknikler ile yapılır. İlave bir uygulamada, alfa-mannosidoz, insan (hLAMAN'dır) ve matür insan alfa-mannosidazı (mhLAMAN) veya bunun bir fragmanı daha da çok tercih edilir. Fragman modifiye edilebilir, bununla
- 25 birlikte enzimin aktif yerleri korunmalıdır.

- Mevcut buluşa göre alfa-mannosidozun preparasyonlarında, enzimin bir fraksiyonunun bunun öncül formu ile temsil edilirken, diğer fraksiyonların yaklaşık olarak 55 ve 70 kDa olan proteolitik olarak işlenmiş formları temsil etmesi beklenecektir. Genel olarak, hedef
- 30 hücre, burada enzimatik aktivitenin, örneğin, alfa-mannosidaz aktivitesinin hücrenin optimal fonksiyonu için yetersiz olduğu, bir hücredir. Alfa-mannosidazın yetersiz aktivitesi, idrarda mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin arttırılmış düzeylerini görüntüleme, bir süjeden elde edilen materyalde, örneğin, lökositlerde ve/veya cilt fibroblastlarında, alfa-mannosidaz aktivitesinin analizi, klinik semptomların varlığı veya

alfa-mannosidozun klinik semptomlarının gelişmesinin hızında artış arasından seçilen parametrelerin biri veya birden fazlası ile ölçülebilir.

5 Yetersiz alfa-mannosidaz aktivitesinin anlamlı bir özelliği, burada mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin bir masif intraselüler birikiminin mevcut olduğu bir hücredir. Doğal olarak, bu tarz hücre, mevcut buluşa göre bir hedef hücredir. Hedef hücre ayrıca, sinir sisteminin bir hücresi de olabilir. Buna ek olarak, enzimi aktarmak için hedef hücreler ayrıca, insan monositleri, insan fibroblastları, insan lenfositleri, insan makrofajları arasından seçilen bir veya birden fazla hücre tipini de içerir.

10

Alfa-mannosidazın bir arttırılmış aktivitesi, bir tedavi planlamasının başarısını değerlendirmek için bir parametre olarak kullanılabilir. Aktivite, idrarda mannoz açısından zengin oligosakkaritlerin arttırılmış düzeylerini görüntüleme, hastadan elde edilen materyalde, örneğin, lökositlerde ve/veya cilt fibroblastlarında, alfa-mannosidaz 15 aktivitesinin analizi, klinik semptomların varlığı veya alfa-mannosidozun klinik semptomlarının gelişmesinin hızında artış arasından seçilen parametrelerin biri veya birden fazlası ile ölçülebilir.

20 Bir olası enzim kusurunun prenatal olarak tedavisini gerçekleştirmek buluşun çok önemli bir yönüdür. Buluşun bir ilave yönünde, hücrel membran, fetal-maternal bariyerdir (plasentadır). Kan berin bariyeri durumunda olduğu gibi, enzimin fetal-maternal bariyerden gerçek aktarımının veya fetal-maternal bariyerin bozulmasının gereksiz olması ve arzu edilmemesi mevcut buluşun önemli bir karakteristiği olabilir.

25 Mevcut buluşun çeşitli yönlerinin ve bu yönlerin spesifik uygulamalarının yukarıdaki açıklaması bakımından, buluşun bir yönü ve/veya bir yönünün bir uygulaması ile bağlantılı olarak yukarıda tarif edilen veya bahsedilen herhangi bir özelliğin ve karakteristiğin ayrıca kıyas yoluyla, tarif edilen buluşun herhangi bir veya tüm diğer yönleri ve/veya uygulamaları için de geçerli olduğu anlaşılmalıdır.

30

Mevcut başvuruda, mevcut buluşa göre bir obje veya bunun özelliklerinin veya karakteristiklerinin biri tekil hâlde ifade edildiğinde, bu ayrıca çoğul hâldeki objeyi veya bunun özelliklerini veya karakteristiklerini de ifade eder. Bir örnek olarak, "bir hücre" ifade edildiğinde, bunun bir veya birden fazla hücreyi ifade ettiği anlaşılacaktır.

35

Mevcut spesifikasyon boyunca "içermek" sözcüğünün veya varyasyonlarının, örneğin, "içerir" veya "içeren", bir ifade edilen elemanın, tam sayının veya adımın veya elemanlar, tam sayılar veya adımlar grubunun dâhil edildiğini, ancak herhangi bir başka elemanın, tam sayının veya adımın veya elemanlar, tam sayılar veya adımlar grubunun dışlanmadığını gösterdiği anlaşılabacaktır.

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

Şekil 1: Bovin, fare ve insan LAMAN'ının polipeptit paterni

10 Bovin böbreğinden veya fare veya insan LAMAN'ını aşırı-eksprese eden hücrenin salgılarından saflaştırılan LAMAN'ın 10 µg'ı, SDS-PAGE ile ayrılmıştır ve Coomassie Blue ile boyanmıştır. Fare ve insan LAMAN'ında görülen 130 kDa'luk polipeptit, öncüllere ve 11 ila 70 kDa aralığındaki polipeptitler LAMAN'ın proteolitik olarak işlenmiş formlarına karşılık gelir. Bovin LAMAN'ındaki 46-48

15 kDa'luk polipeptit, kısmen işlenmiş ara-ürünleri temsil eder.

Şekil 2: Karaciğerdeki, dalaktaki, böbrekteki ve kalpteki nötral oligosakkaritlerin ince-tabaka kromatografisi.

Dokuların eşit miktarlarından elde edilen nötral oligosakkaritlerin fraksiyonu, 20 ince-tabaka kromatografisi ile ayrılmıştır. Satı 1, kontrol farelerinden; sütun 2, sahte-enjekte edilmiş LAMAN farelerinden örnekleri; sütun 3, 4 ve 5, vücut ağırlığının her bir g'ı için 100 mU fare LAMAN'ı enjekte edilmiş ve sırasıyla 2, 4 ve 10 saat sonra öldürülmüş α-mannosidoz farelerinden örnekleri içerir (bakınız, ayrıca Tablo 1). Oligosakkaritler, orsinol/sülfürik asit ile saptanmıştır. Küt

25 le spektrometrisi ve Hint baklası α-mannosidazına duyarlılık, M2 ila M9 arasındaki oligosakkaritlerin indirgeme ucunda 2 ila 9 mannoz rezidüsü ve bir tek N-asetilglukozamin rezidüsü içerdiğini göstermiştir. Oligosakkaritler, dansitometri ile kantifiye edilmiştir. Depolamanın hesaplanması için, α-mannosidoz farelerde nötral oligosakkaritler için değerler, kontrol farelerindeki nötral oligosakkaritler

30 için düzeltilmiştir ve sahte-enjekte edilmiş α-mannosidoz farelerindeki yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Küt le spektrometrisi ve Hint baklası α-mannosidazına duyarlılık, M2 ila M9 arasındaki oligosakkaritler indirgeme ucunda 2 ila 9 mannoz rezidüsü ve bir tek N-asetilglukozamin rezidüsü içerir.

Şekil 3: Vücut ağırlığının her bir g'ı için 100 mU fare LAMAN'ı enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinin doku ekstraktlarındaki nötral oligosakkaritler.

Farelerde enjeksiyondan 4, 8 ve 16 gün sonra öldürülmüştür ve karaciğerin, dalağın, böbreğin ve kalbin ekstraktlarındaki nötral oligosakkaritler ince tabaka kromatografisi ile ayrılmadan sonra dansitometri ile kantifiye edilmiştir (bakınız, Şekil 2'nin lejantı).

Şekil 4: Serumdan LAMAN'ın klirensi

Bovin ($\square$), fare ($\blacksquare$) veya insan ($\circ$) orijinli LAMAN, 50 mU/g vücut ağırlığı, 8 haftalık α -mannosidoz farelerinin kuyruk venine enjekte edilmiştir. Kan, enjeksiyondan 5 ila 65 dakika sonra retroorbital pleksustan toplanmıştır. Her bir değer, iki hayvanın ortalamasını temsil eder. Aralık, çubuklar ile gösterilir, burada bu sembollerin boyutunu aşar.

Şekil 5: Bovin, fare ve insan LAMAN'ının nötral oligosakkaritlerin depolanması üzerindeki düzeltici etkisi

Fareler, doku analizinden 2 gün önce, vücut ağırlığının her bir g'ı için 50 mU LAMAN almıştır (bakınız, Şekil 3). Nötral oligosakkaritler, Şekiller 2'de ve 3'te olduğu şekilde kantifiye edilmiştir. Çubuklar, iki bağımsız farede gözlenen aralığı gösterir.

Şekil 6: Vücut ağırlığının her bir g'ı için insan α -mannosidazının 250 mU'luk bir tek dozunun enjeksiyondan sonra α -mannosidoz farelerinin doku ekstraktlarındaki nötral oligosakkaritler

Fareler, enjeksiyondan 1, 3, 6 ve 12 gün sonra öldürülmüştür. Karaciğerin, dalağın, böbreğin ve kalbin doku ekstraktlarındaki nötral oligosakkaritler, Şekiller 1'de ve 2'de olduğu şekilde ince-tabaka kromatografisi ve dansitometri ile kantifiye edilmiştir.

Şekil 7: Karaciğerde A, C, E, ışık mikroskobu (yarı-önce kesitler); B, D, F, Kupffer hücrelerinin ultra-yapısında depolama kofullarının kaybolması ve yeniden-görülmesi; A, B, sahte-enjekte edilmiş α -mannosidoz fareleri (14 haftalık).

Hepatositler, safra kanalikülü boyunca net kofullar gösterir (A, oklar). Ağır bir şekilde kofullanmış sinüs duvarı hücreleri, (B)'de görüldüğü şekilde kofullar

- arasındaki hayli dar sitoplazma köprülerinden dolayı, ışık mikroskobu düzeyinde (A) net bir şekilde ayrıt edilmez. C, D, α -mannosidoz faresi, vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ının enjeksiyonundan 1 gün sonra. Kofullar, hepatositlerden kaybolmuştur. Çok az kofullanmış sinüs duvarı hücreleri görülür (C, ok). Kupffer hücrelerindeki kofullar, sahte-muamele edilmiş hayvandakine kıyasla daha küçüktür ve bir elektron-yoğun matriks içerebilir (D). E, F, α -mannosidoz faresi, vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ının enjeksiyonundan 12 gün sonra. Kofullar, sinüs duvarı hücrelerinde yeniden görülmüştür (E, oklar) ve hepatositlerde olandan daha azdır. Kupffer hücrelerinde (F) kofullar sahte-enjekte edilmiş farelerdekine kalitatif olarak benzer. A'da, C'de ve E'de gösterilen hepatositlerdeki yoğun kalıntılar, karşılık gelen doğal tip farelerde (gösterilmemiştir) eşit şekilde karşılaşılan lipid damlacıklarını temsil eder. Çubuklar, sırasıyla 20 μ m'yi ve 2 μ m'yi temsil eder.
- Şekil 8: Vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ı iki kere enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinin doku ekstraktlarındaki nötral oligosakkaritler Kontrol (sütun 1) ve α -mannosidoz farelerine (sütun 2 ve 3), analizden 7 ve 3,5 gün önce PBS (sütun 1 ve 2) veya vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ı (sütun 3) enjekte edilmiştir. Nötral oligosakkaritler hazırlanmıştır ve Şekil 1'de ve 2'de olduğu şekilde kantifiye edilmiştir. 2 ila 9 mannoz rezidüsünden ve bir tek N-asetilglukozamin rezidüsünden oluşan oligosakkaritlerin (M2 ila M9) göçü gösterilir. Oklar, LAMAN'a duyarsız olan orsinol-pozitif materyali işaretler. Farelerin bir iki kopya-hâlindeki setindeki sonuçlar (gösterilmemiştir), %15'ten daha az çeşitlilik göstermiştir.
- Şekil 9: α -mannosidoz farelerinde böbreğin ışık mikroskobu α -Mannosidoz farelerine, öldürülmeden 7 ve 3,5 gün önce PBS (A) veya vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ı (B) enjekte edilmiştir. Dış medullanın dış şeridi gösterilir. Çok sayıda net koful, LAMAN ile muamele edilmiş fareye (B) kıyasla sahte-enjekte edilmiş farenin (A, oklar) Henle kulbunun kalın asendan kolunda (TAL) görülür. Proksimal düz tübüller (PST), her iki hayvanda da patolojik kofullardan yoksundur. Çubuklar, 20 μ m'yi temsil eder.

Şekil 10: Beyinden elde edilen 2-antranilamid türevlendirilmiş nötral oligosakkaritlerin HPLC ile ayrılması

Öldürülmeden 7 ve 3,5 gün önce PBS (üst tarama) veya vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ı (alt tarama) enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinin beyininden elde edilen nötral oligosakkaritler, bir iç standart olarak 220 pmol GlcNAc₄Man₃Gal₃ ile karıştırılmıştır, 2-antranilamid ile türevlendirilmiştir ve HPLC ile ayrılmıştır. İç standardın ve 2 ila 9 mannoz rezidüsünden ve bir tek N-asetilglukozamin rezidüsünden oluşan oligosakkaritlerin (M2 ila M9) pozisyonu gösterilir.

ÖRNEKLER

Örnek 1: LAMAN'ın üretilmesi ve karakterizasyonu

DeneySEL prosedürler

CHO hücrelerinde rekombinant insan LAMAN'ının ekspresyonu ve saflaştırılması

HepG2 cDNA kütüphanesinden izole edilmiş ve insan CMV-promotörü kontrolü altında bir dihidrofolat redüktaz geni ve LAMAN cDNA'sı taşıyan bir ekspresyon vektörüne alt-klonlanmış insan LAMAN cDNA'sı, dihidrofolat redüktazdan yoksun olan Çin Hamsteri Over (CHO) hücrelerinde eksprese edilmiştir. CHO hücreleri, 20 nM metotreksat ile takviye edilmiş serumsuz ExCell 302 vasatı (JRH Biosciences) içinde bir iki-kompartımanlı CELLline flask (Integra Biosciences Inc.) içinde %5 CO₂ içeren bir nemlendirilmiş atmosferde 37°C'de kültürlenmiştir. Vasat, 4 hacim 0,02 M Tris-HCl'ye, pH 7,6, karşı bir 100 kDa'luk kesim değeri ile bir Pellicon Biomax polisülfon filtre kullanılarak diyafiltre edilmiştir. İyon-değişim kromatografisi, 0,02 M Tris-HCl, pH 7,6, içinde bir NaCl gradyanı kullanılarak DEAE-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech AB) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Aktif fraksiyonlar, bir 30 kDa'luk kesim değeri ile bir Amicon Centricon Plus-80 sentrifügasyon filtresi kullanılarak konsantre edilmiştir ve 0,15 M NaCl içeren 0,02 M Tris-HCl, pH 7,6 içinde bir HiPrep 26/60 Sephacryl High Resolution kolon (Amersham Pharmacia Biotech AB) içinde jel filtrasyonuna tabi tutulmuştur. Konsantrasyondan sonra, nihai preparasyon, 9/15 U/mg'lık bir spesifik aktiviteye sahiptir.

Rekombinant fare LAMAN'ının ekspresyonu ve saflaştırılması

Fare LAMAN'ını şifreleyen cDNA (16), pMPSVEH ekspresyon vektörüne alt-klonlanmıştır (17). Bir polihistidin kuyruğu (6 rezidü), enzimin C-ucu parçasına eklenmiştir. Küçük ve büyük mannoz 6-fosfat reseptörleri açısından kusurlu olan fare embriyonik fibroblastları (mpr^{-/-} MEF) (18) transfekte edilmiştir ve kalıcı bir şekilde eksprese eden klonlar, 50 µl/ml higromisin ile seçilmiştir. Rekombinant fare LAMAN'ının üretilmesi için, hücreler, %10 FCS ile takviye edilmiş vasat içinde %5 CO₂ içeren bir nemlendirilmiş atmosfer içinde kültürlenmiştir. Salgılanmış rekombinant fare LAMAN'ı, şartlandırılmış vasattan bir üç adımlı prosedür kullanılarak saflaştırılmıştır. Birinci adımda, vasat, 500 mM sodyum klorür içeren 20 mM sodyum fosfat tamponuna, pH 7,8, karşı diyalize edilmiştir ve akabinde bir Probond kolona (Invitrogen) yüklenmiştir. Alıkonulmuş enzim, 500 mM sodyum klorür içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu, pH 6,0, içinde bir 0 ila 0,35 M aralığında imidazol gradyanı (toplam hacim 80 ml) ile ayrıştırılmıştır. Fraksiyonlar içeren LAMAN, 10 mM sodyum fosfata, pH 6,0, karşı diyalize edilmiştir ve bir DEAE-selüloza yüklenmiştir. Enzim, 10 mM sodyum fosfat tamponu içinde bir 0 ila 0,25 M aralığında sodyum klorür gradyanı (toplam hacim 80 ml) içinde ayrıştırılmıştır. Son olarak, fare LAMAN'ı, ConA-Sepharose'a (1 mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂ ve 0,5 M NaCl içeren yükleme tamponu 20 mM Tris-HCl, pH 7,4) adsorbe edilmiştir ve aynı tampon içinde α-mannopiranosit (0,0-1,0 M) ile ayrıştırılmıştır. Nihai preparasyon, 17/25 U/mg olan bir spesifik aktiviteye sahiptir.

Bovin LAMAN'ının saflaştırılması

Bovin LAMAN'ı, tarif edildiği şekilde (19) böbrekten saflaştırılmıştır. Nihai preparasyon, 10 U/mg olan bir spesifik aktiviteye sahiptir.

İnsan LAMAN'ının saflaştırılması

LAMAN, %5 CO₂ içeren bir nemlendirilmiş atmosfer içinde 37°C'de bir iki-kompartımanlı CELLline flask içinde kültürlenmiştir. CHO-hücrelerinden elde edilen enzim, 4 adımdan oluşan bir saflaştırma prosedürüne göre saflaştırılmıştır:

Diyafiltrasyon

Diyafiltrasyon, bir 100 kDa'luk kesim değeri olan bir Pellicon Biomax polisülfon filtre kullanılan TFF modeline göre yapılmıştır. Örnek, 0,02 M Tris-HCl, pH 7,6, ile yaklaşık olarak 3 x örnek hacmine karşı diyafiltre edilmiştir.

5 İyon değişim kromatografisi

İyon değişim kromatografisi, DEAE Sepharose akış filtrasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tampon, 0,02 M Tris-HCl'dir, pH 7,6. Jel, Amersham Pharmacia Biotech AB firmasından bir XK 16/20 kolon içine dolgulanmıştır. Ayrıştırma, NaCl'nin bir gradyanı ile gerçekleştirilmiştir.

Örneğin konsantrasyonu

Jel filtrasyonundan önce, örnek, ~6 mg/mL olan bir protein konsantrasyonuna ve 10 mL'lik bir nihai hacme konsantre edilmiştir. Bu, bir 30 kDa'luk kesim değeri olan bir Amicon Centricon Plus-80 sentrifügasyon filtresi kullanılarak yapılmıştır.

Jel filtrasyonu

Jel filtrasyonu, Amersham Pharmacia Biotech AB firmasından bir HiPrep 26/60 Sephacryl High Resolution kolonunda yürütülmüştür. Örnek, 0,15 M NaCl, pH 7,6, ile takviye edilmiş 0,02 M Tris-HCl ile ayrıştırılmıştır.

Bir LAMAN saflaştırmasının örneği, aşağıdaki tabloda özetlenir. Normal olarak, Verim, %30 - 50 ve spesifik aktivite 9 - 15 U/mg aralığındadır.

LAMAN saflaştırılmasının özeti

Saflaştırma adımı	Protein konsantrasyonu mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma faktörü	Verim (%)
Ham enzim	3,3	0,89	1,00	100
Diyafiltrasyon	2,0	2,28	2,56	130
İyon değişimi	1,4	3,61	4,06	54

Saflaştırma adımı	Protein konsantrasyonu mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma faktörü	Verim (%)
Konsantrasyon	5,8	6,01	6,75	66
Jel filtrasyonu	0,8	10,87	12,21	64
Konsantrasyon	6,4	9,65	10,84	32

Saflaştırılmış LAMAN, -80°C'de saklanır.

- 5 Buna ek olarak, 20-200 ml'lik ölçekte rhLAMAN için bir saflaştırma prosesi, büyük ölçekte üretime ölçek-büyütmek için geliştirilir. Nihai ürünün (rhLAMAN) kalitesi ve saflığı, çok yüksektir ve (klinik çalışmalar için onaylanmış) spesifikasyonlara göredir. Proses, bir yakalama adımı, 1-2 ara saflaştırma adımı, 1 parlatma adımı, 1-2 virüs uzaklaştırma adımı ve 1 formülasyon adımı içerir. 1 veya daha fazla tampon değiştirme
- 10 adımı da dâhil edilir (diyafiltrasyon). Küçük-ölçekli proses, ara ve nihai olarak büyük-ölçekte üretime transfer edilir.

Deneyisel tasarım: Bir kaç farklı kromatografi jeli test edilir ve farklı adımların performansı, aşağıda kısaca tarif edilen bir dizi analitik yöntem ile analiz edilecektir:

15

<u>Enzim aktivitesi:</u>	Alfa-mannosidaz analizi
<u>Toplam protein konsantrasyonu:</u>	BCA analizi
<u>rhLAMAN konsantrasyonu:</u>	rhLAMAN ELISA
<u>Saflık:</u>	HPLC ve SDS-PAGE
<u>Kimlik:</u>	HPLC
<u>HCP proteinleri:</u>	ELISA
<u>Endotoksin düzeyi:</u>	Sözleşme Lab'ı dışından destek alınır

20 ml'lik kolon ölçeğinde saflaştırma prosesinin genel hatlarıyla özeti

Adım 1: Konsantrasyon/Diyafiltrasyon

Eksprese edilmiş rhLAMAN ile T-500'lük flasklar (0,06 U/ml) içinde üretilen vasatlar, 100 kDa'luk kesim değeri olan bir Pellicon Biomax polisülfon filtresine karşı Teğetsel akış filtrasyonu (TFF) kullanılarak yaklaşık olarak 10x'e konsantre edilir.

- 5 Örnek: 0,5 - 1,0 litrelik döndürücü ile üretilen vasatlar, bir 50 cm² Biomax 100 kDa'luk filtreye karşı TFF kullanılarak 50 - 100 ml'ye konsantre edilir. Transmembran basıncı (TMP), 25'dir (Pin = 30 psi; Pout = 20 psi). Bundan sonra, 25'lik TMF ile 7 hacim 20 mM Tris-HCl'ye, pH 7,6, karşı diyafiltrasyon uygulanır. Konsantre edilmiş örneğin spesifik aktivitesi, 0,5 - 1,5 U/mg'dır. Verim, %70 - 10 90'dır.

Adım 2: Yakalama adımı - DEAE sefaroz FF

- 15 Adım 1'den konsantre edilmiş örnek, 20 mM Tris-HCl pH 7,6, (standart tampon olarak ifade edilir) ile dengelenmiş bir 16 mm çaplı kolon (Pharmacia XK 16) içine dolgulanmış bir 20 ml DEAE sefaroza uygulanır. Akış hızı, 3 ml/ dakika 'dır. DEAE jeline bağlanmış protein sonrasında, standart tamponun 2-4 kolon hacmi (CV) akabinde standart tampon içinde 30 mM NaCl'lik 2-4 CV ile yıkanır.
- 20 rhLAMAN, 20 dakika boyunca standart tampon içinde 30 - 300 mM NaCl aralığında bir lineer gradyan ile ayrıştırılır. Büyük ölçekte üretim için alternatif olarak: Ayrıştırma, standart tampon içinde 75 - 150 mM NaCl uygulama ile başarılıdır. DEAE jeli, standart tampon içinde 0,5 M NaCl'nin 2-4 CV'si akabinde 1,0 M NaOH'ın 2,4 CV'si (temas süresi 40 - 60 dakika) ile yıkanır. rhLAMAN aktivitesi içeren fraksiyonlar, havuzlanır 25 (spesifik aktivite: 2 - 5 U/mg) ve ilave saflaştırma için kullanılır. Verim, %70 - 90.

Adım 3: Ara adım 1

1. *Hidrofobik etkileşim kromatografisi: bütül, fenil veya oktil sefaroz FF.* Adım 2'den 30 elde edilen örnek havuzu 2,0 M Na₂SO₄ ile 1:1 karıştırılır ve standart tampon + 1,0 M Na₂SO₄ ile dengelenmiş bir 16 mm çaplı kolon (Pharmacia XK 16) içine dolgulanmış bir 20 ml HIC kolonuna (bütül-, fenil- veya oktil-sefaroz) uygulanır. Akış hızı, 3-4 ml/ dakika 'dır. Kolon, aynı tamponun 2-4 CV'si ile yıkanır. rhLAMAN, standart tampon ile ayrıştırılır ve aktivite içeren fraksiyonlar 35 havuzlanır ve ilave saflaştırma için kullanılır.

2. *Makroprep, Seramik hidroksiapatit tip I veya II.*

Özet açıklama: 10 mM Sodyum fosfatın, pH 7,6, (Tampon A) 4-6 CV'si ile Denge kolonu (Jel hacmi = 20 ml). Akış hızı, 2-5 ml/ dakika 'dır. Adım 3'ten elde edilen örneğin TFF ile Tampon A'ya tamponu değiştirilir. Adım 3'ten elde edilen elde edilen örnek, kolona yüklenir. Tampon A'nın 2-4 CV'si ile yıkanır. 100 mM NaCl içeren tampon A ile ayrıştırılır. rhLAMAn aktivitesi içeren pik toplanır.

Adım 4: Ara adım 2

10 1. *Makro prep, Seramik hidroksiapatit tip I veya II, 40 µm.*

Kısa açıklama: bakınız Adım 3

2. *Source 15 Q - anyon-değiştirici*

200 mM Tris-HCl'nin, pH 7,6, 4 CV'si ile kolon dengelenir. 20 mM Tris-HCl'nin, pH 7,6, (standart tampon) 5 CV'sine değiştirilir. Akış hızı: 2 - 5 ml/ dakika . Adım 3'ten elde edilen örnek (uygulamadan önce standart tampon içinde olmalıdır) kolona yüklenir. Standart tamponun 2-4 CV'si ile yıkanır. Standart tampon içinde 1 M NaCl'nin %0 ila 100 aralığındaki bir sıg gradyanı (akış hızı 2 ml/ dakika, gradyan süresi 50 dakika) uygulanır. rhLAMAn aktivitesi içeren fraksiyonlar toplanır.

3. *Source 15 S - katyon değiştirici*

Asidik pH içinde yürütülmelidir. Denge tamponu = 20 mM Sodyum Asetat, pH 4,5. Bir NaCl (artan tuz konsantrasyonu) veya pH (artan pH) gradyanı ile ayrıştırılır.

25 **Adım 5: Parlatma adımı**

1. *Makro prep, Seramik hidroksiapatit tip II, 40 µm.*

Parametrelerin açıklaması: bakınız, Adım 3.

2. *Source 15 Q - anyon değiştirici*

30 Parametrelerin açıklaması: bakınız, Adım 4.

3. *Source 15 S - katyon değiştirici*

Parametrelerin açıklaması: bakınız, Adım 4.

4. *Afinite kromatografisi*

35 **Adım 6: Diyafiltrasyon/ Formülasyon adımı**

Formülasyon adımının 5-10 x Hacme karşı 100 kDa'luk kesim değeri olan bir Pellicon Biomax polisülfon filtreye karşı Teğetsel akış filtrasyonu (TFF) gerçekleştirilir. İki formülasyon tamponu test edilir:

5

Formülasyon tamponu 1.

Na_2HPO_4	3,10-3,50 mM
NaH_2PO_4	0,4-0,6 mM
Glisin	25-30 mM
Mannitol	220-250 mM

Enjeksiyonluk su (WFI)

10

Formülasyon tamponu 2.

Sodyum Sitrat	4,0-5,0 mM
Sitrik Asit	0,3-0,8 mM
Mannitol	200-250 mM
Tween 80	3,0-5,0 mM

Enjeksiyonluk su (WFI)

15

Her iki Formülasyon tamponunda pH ve ozmolalite sırasıyla, $7,5 \pm 0,2$ 'ye ve 300 ± 50 mOsm/kg'a dengelenir. Nihai protein konsantrasyonu, spesifikasyona göredir (>5 mg/ml).

20 **Adım 7: Formülasyon, Doldurma ve Dondurarak-kurutma**

Formülasyon ve dozaj formu

25 Dozaj formunun geliştirilmesinde, rhLAMAN'ın kararlılığına odaklanılır. Geliştirme prosesi, bir sulu çözelti ile başlar ve büyük olasılıkla bir dondurarak-kurutulmuş ürün

olarak sonlanacaktır. İki farklı formülasyon test edilir: Formülasyon tamponu 1 ve Formülasyon tamponu 6, bakınız, Adım 6.

5 Bu her iki formülasyonun, sulu çözeltiler içinde aynı zamanda dondurarak-kurutulmuş tozlar içinde proteinleri stabilize ettiği bilinir. Her iki Formülasyon tamponunda pH ve ozmolalite sırasıyla, $7,5 \pm 0,2$ 'ye ve 300 ± 50 mOsm/kg'a dengelenecektir. Nihai protein konsantrasyonu, spesifikasyona göre ve 4-10 mg/ml aralığında olmalıdır.

10 rhLAMAN'ın bir dondurarak-kurutulmuş ürünü, EU GMP uygulamasına göre bir üretim biriminde üretilenektir. Doldurma ve dondurarak-kurutma, Sınıf A olarak sınıflandırılmış bir odada gerçekleştirilecektir. Üretim sırasında, doldurma alanı, parçacık sayımı ve çökeltme plakası ile izlenir. Personel, EU GMP'ye göre düzenli olarak eğitilir ve eldiven izleri ile her bir üretimden sonra izlenir. Ekipmanın ve materyallerin sterilitesi, valide edilmiş sterilizasyon prosedürleri ile güvence altına alınır.

15

Doldurma

rhLAMAN'ın yığın ilaç maddesi, steril tip 1 cam viyallere aseptik olarak doldurulur.

Dondurarak-kurutma

Viyaller, yukarıda tarif edilen iki farklı formülasyon içinde rhLAMAN için spesifik olarak geliştirilmiş dondurarak-kurutma siklusları ile dondurarak-kurutulur. Nitrojen gazı, siklus sonunda viyallere doldurulur ve nihayetinde tapalar ile kapatılır ve başlık takılır. Seri 25 son olarak analiz edilir ve spesifikasyona göre piyasaya sürülür.

LAMAN fosforilasyonunun belirlenmesi

30 LAMAN, tarif edildiği üzere (20) bir MPR 300 afinite matriksi ile gece boyu inkübe edilmiştir. LAMAN aktivitesi, bağlı olmayan fraksiyonda belirlenmiştir ve fraksiyonlar, 5 mM glikoz 6-fosfat ve 5 mM mannoz 6-fosfat ile ayrıştırılmıştır.

Sonuçlar

Üç farklı türden saflaştırılan LAMAN, α -mannosidoz farelerde enzim replasmanı için kullanılmıştır (Şekil 1). Bovin böbreğinden elde edilen LAMAN, bir ortak öncülden sınırlandırılmış proteoliz ile üretilen polipeptitlerin (11-38 kDa) bir karışımı ile temsil edilir (19). Dokudan saflaştırılmış ve böylece endozomal/lizozomal fosfataz aktivitesine maruz bırakılmakta olan bir lizozomal hidrolaz için beklenildiği üzere, enzim bir düşük Man6P-tanım belirteci içeriğine sahiptir. Bir Man6P-reseptörü afinite matriksi ile inkübe edildiğinde, LAMAN aktivitesinin %6,4'ü, bir Man6P-bağımlı şekilde matrikse bağlanmıştır.

- 10 Rekombinant fare ve insan LAMAN'ı sırasıyla, Man6P-reseptörü kusurlu fare fibroblastlarının ve CHO hücrelerinin salgılarından izole edilmiştir. Enzimler büyük ölçüde, bunların öncül formları ile temsil edilmiştir, ancak 55 ve 70 kDa'luk proteolitik olarak işlenmiş formların bir değişken fraksiyonunu (%5-35) içermiştir (Şekil 1). Fare LAMAN'ı, aktivitenin %73,6'sının afinite matriksini bağlamasına aracılık eden daha yüksek bir Man6P-tanım belirteci içeriğine sahiptir. İnsan LAMAN'ının yalnızca %4,2'si bir Man6P-bağımlı şekilde Man6P-reseptörü afinite matriksini bağlamıştır, bu Man6P-tanım belirtecinin bovin LAMAN'ı için olduğu kadar düşük olduğunu gösterir.

Bir kaç seri, örneğin, aşağıdakiler, bunu takiben analiz edilmiştir:

20

havuzlanmış seri 2003-09 - 2004-02:	%40 fosforilasyon
seri 2004-02-02 - 06:	%30 fosforilasyon
havuzlanmış seri 2003-01-21 - 04-16	%42 fosforilasyon

- Genel olarak, enzimin miktarının yaklaşık olarak %40'ı, afinite matriksini bağlar. İnsan ve bovin LAMAN'ı için gözlenen düşük fosforilasyon derecesinin enzimlerin uzatılmış depolanmasından kaynaklandığına inanılır.

25

Örnek 2: LAMAN'ın in vivo uygulanmasının depolanmış oligosakkaritlerin düzeyleri üzerindeki etkileri

- 30 **DeneySEL prosedürler**

Farelerin enjeksiyonu

LAMAN, 8-14 haftalık α -mannosidoz farelerinin kuyruk venine enjekte edilmiştir (nihai hacim en fazla 5,3 μ l/g vücut ağırlığı). Sahte-enjekte edilmiş fareler, 0,15 M NaCl (PBS) içinde aynı hacimde 10 mM fosfat, pH 7,4, almıştır. Bir tek deneyde, en fazla üç yavrudan köken alan fareler, yaş açısından farklı değildir. Enjeksiyondan 5 dakika sonra, kan, enjekte edilmiş enzimin miktarı için kontrol etmek için retroorbital pleksustan alınmıştır. Serum hazırlanmıştır ve -20°C'de saklanmıştır.

Organ ekstraktlarının preparasyonu

Farelere, 0,15 M NaCl içinde bir 10 mg/ml Ketavet (Parke Davis) ve 2 mg/ml Rompun (Bayer) çözeltisinin 20 μ l'si ile anestezi uygulanmıştır ve fareler PBS ile perfüze edilmiştir. Organlar (karaciğer, dalak, böbrek, kalp ve beyin) alınmıştır ve -78°C'de saklanmıştır. Her bir organın yaklaşık 50-70 mg'ı, (ağırlık olarak) 9 hacim 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF (izopropanol içinde), 1 mM iyodoasetamid, 5 mM EDTA içinde 4°C'de homojenize edilmiştir. Triton X-100, ağı/hacim %0,5 (karaciğer için %1) olan bir nihai konsantrasyona kadar eklenmiştir. Buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübasyondan sonra, örnekler sonike edilmiştir ve akabinde 13000 g'de 15 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir. Süpernatant, -20°C'de saklanmıştır.

Enzim analizleri

Organ ekstraktlarında ve serumda LAMAN aktivitesinin belirlenmesi için, enzim örneğinin 10-50 μ l'si 37°C'de 0,5-5 saat boyunca 0,2 ml 0,2 M sodyum sitrat, pH 4,6, %0,08 NaN_3 , %0,4 BSA, %0,15 NaCl ve substrat olarak 10 mM p-nitrofenil- α -mannopiranosit içinde inkübe edilmiştir. 1 ml 0,4 M glisin/NaOH, pH 10,4, reaksiyonu durdurmak için eklenmiştir. Absorbans, 405 nm'de okunmuştur ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Tüm belirlemeler iki kopya hâlinde ve uygun kör-çözeltiler ile yapılmıştır.

30

Western blotlama

İnsan LAMAN'ının Western blotlanması için, proteinin 20-40 μ g'ı, bir %10'luk SDS-poliakrilamid jel üzerinde ayrılmıştır. SDS-PAGE elektroforezinden sonra, proteinler bir yarı-kuru blotlama sistemi kullanılarak PVDF membranlarına transfer edilmiştir.

35

Transfer etkililiği, Ponceau boyama ile kontrol edilmiştir. Membranlar bunu takiben, %5'lik yağsız süt tozu ile bloke edilmiştir ve bir 1:50.000'lik veya 1:100.000'lik seyreltme içinde primer antikor ile inkübe edilmiştir. PBS, %0,1 Tween 20, içinde yıkandıktan sonra, blotlar sekonder antikorlara kuple edilmiş yaban turpu peroksidazı (HRP) (1:20.000) ile inkübe edilmiştir. Sinyaller, ECL-Detection System (Amersham, Freiburg, Germany) kullanılarak görselleştirilmiştir.

Nötral oligosakkaritlerin izolasyonu

Doku örnekleri (50-60 mg), küçük parçalara kesilmiştir ve 4°C'de 0,6 ml H₂O (HPLC derecesinde) ile homojenize edilmiştir. İki here dondurmadan (-20°C) ve çözülmeden ve ultrasonik muameleden sonra, proteinler 4 hacim metanol eklenmesi ile çöktürülmüştür ve 4 hacim kloroform/H₂O (1:3) eklenmesi ile ekstrakte edilmiştir (21). Süpernatant, 4°C'de karma-yataklı iyon-değişim reçinesi (AG 501-X8, 20-50 elek) ile 1 saat boyunca inkübasyon ile tuzundan arındırılmıştır. Bağlanmamış materyal liyofilize edilmiştir ve su (dokunun her bir mg'ı için 1 ml) içinde yeniden-süspanse edilmiştir.

Mannoz oligosakkaritlerinin ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılması

Dokunun eşit alikotlarından ekstrakte edilen nötral oligosakkaritler, TLC plakalarına (20x20 Silica gel F60, Merck) yüklenmiştir. Plakalar oda sıcaklığında ~1 saat kurutulduktan sonra, oligosakkaritler n-bütanol/ asetik asit/ H₂O (100:50:50) ile gece boyu geliştirme ile ayrılmıştır. (Oda sıcaklığında ~1 saat ve akabinde 110°C'de 5 dakika) kurutulduktan sonra, plakalar n-propanol/ nitrometan/ H₂O (100:80:60) içinde 4 saat boyunca geliştirilmiştir. Boyama için, plakalara H₂SO₄ (su içinde %20) içinde %0,2 orsinol püskürtülmüştür ve plakalar 110°C'de ısıtılmıştır. Oligosakkaritlerin boyutu, MALDI-TOF ile belirlenmiştir (aşağıya bakınız).

Karaciğer oligosakkaritlerinin α-glukosidaz veya Hint baklası α-mannosidazı ile sindirilmesi

Glikojen kaynaklı oligosakkaritler ile girişimden kaçınmak için, karaciğerden ve kalpten elde edilen oligosakkarit ekstraktlarının 20 µl'si, 20 mM fosfat, pH 6,8, içinde *Bacillus stearothermophilus*'tan (Sigma) elde edilen 40 U/ml α-glukosidaz ile 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon karışımı, proteinleri denatüre etmek için 96°C'ye

ısıtılmıştır. 13000 g'de 10 dakika Sentrifügasyondan sonra, süpernatant bir iyon-değişim reçinesi (AG 501-X8, 20-50 elek) ile 4°C'de 1 saat inkübasyon ile tuzundan arındırılmıştır, liyofilize edilmiştir ve 20 µl su içinde yeniden-süspanse edilmiştir ve akabinde TLC ile ayrılmıştır.

5

Oligosakkaritlerin doğasını doğrulamak için, oligosakkarit ekstraktlarının 20 µl'si 2 mM ZnCl₂ içeren 0,1 M sodyum asetat, pH 5,0, içinde Hint baklasından elde edilen 30 U/ml α-mannosidaz (Sigma) ile 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra, oligosakkaritler, α-glukosidaz ile sindirilmiş örnekler için tarif edildiği şekilde hazırlanmıştır ve TLC ile ayrılmıştır.

10

Organlardaki nötral oligosakkaritlerin kantitatif analizi

Oligosakkaritler (0,3 µl), bir iç standart görevi gören ve GlcNAc₄Man₃Gal₃ bileşimine sahip olan 220 pmol bir dekasakkarit ile karıştırılmıştır. Karışım liyofilize edilmiştir ve 0,34 M 2-antranilamid (Aldrich) ve 1 M NaBH₃CN (Fluka) içeren 5 µl bir DMSO/ asetik asit (7:3) içinde yeniden-süspanse edilmiştir. 65°C'de 2 saat inkübasyondan sonra, örnekler (etil asetat ile geliştirilen) kâğıt kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Başlangıç noktasında lokalize olmuş oligosakkaritler, kâğıdı su içinde sonike etme ile ekstrakte edilmiştir, liyofilize edilmiştir, 300 µl asetonyitril/ 80 mM amonyum format, pH 4,4, (65:35) içinde yeniden-süspanse edilmiştir, bir Gluco-Sepharose kolonuna (Ludger) yüklenmiştir ve asetonyitril/ amonyum format tamponu ile 0,4 ml/ dakika olan bir akış hızında ayrıştırılmıştır. Flüoresans (eksitasyon 350 nm, emisyon 450 nm) kaydedilmiştir (Shimadzu, RF-10A XL) ve oligosakkaritlerin kütlesi MALDI-TIF ile belirlenmiştir.

25

MALDI-TOF

HPLC fraksiyonlarından elde edilen örnekler liyofilize edilmiştir ve 2-3 µl su içinde çözünmüştür. TLC plakalarından su ekstraktları 1-fenil-3-metil-5-pirazolon ile türevlendirilmiştir ve 2-3 µl su içinde çözünmüştür. 2,5-dihidroksibenzoik asit (DHB, su içinde 5 mg/ml) matriks olarak kullanılmıştır. 0,5 µl DHB ve 1 µl örnek Anchorchip hedefi (Bruker Daltonik) üzerine noktalanmıştır ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kütle spektrometrik analiz, bir 337 nm'lik UV lazeri ile bir Reflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonik) cihazında gerçekleştirilmiştir.

35

Histolojik incelemeler

Elektron mikroskobu için, öldürme zamanında toplanan karaciğerin ve dalağın küçük kesitleri 0,1 M fosfat, %6 gluteraldehit, pH 7,4, içine daldırılmıştır. Doku örnekleri, %2 osmiyum tetroksit ile post-fikse edilmiştir, dehidrate edilmiştir ve Araldite içine gömülmüştür. Yarı-ince kesitler, toluidin mavisi ile boyanmıştır. Ultra-ince kesitler, standart tekniklere göre işlenmiştir. Histokimyasal araştırmalar için, kesitler, 10 mM fosfat, pH 7,4, 0,15 M NaCl içinde seyreltilmiş Bouin çözeltisine daldırılmıştır. Gömme, düşük erime noktalı parafin (Wolff, Wetzlar, Germany) içine yapılmıştır. Seri kesitler (7 µm) kesilmiştir ve Biobond (British Biocell, London, UK) ile kaplanmış cam lamalar üzerine yerleştirilmiştir. Her bir serinin merkezi kesitleri standart ışık mikroskobu için hematoksinin ve eosin ile boyanmıştır.

Sonuçlar

15

Fare LAMAN'ının bir tek intravenöz enjeksiyonunun düzeltici etkisi

LAMAN'ın bir tek dozunun nötral oligosakkaritlerin saklanması üzerindeki kısa ve uzun süreli etkisini çalışmak için, 9 haftalık α -mannosidoz fareleri intravenöz olarak, vücut ağırlığının her bir g'ı için 100 mU fare LAMAN'ı almıştır. Enjekte edilmiş enzimin miktarı ve bunun dolaşımdan klirensi için kontrol etmek için, kan enjeksiyondan 5, 30 ve 60 dakika sonra alınmıştır. Enjeksiyondan 5 dakika sonra, LAMAN aktivitesi $\pm$ %6'dan daha az çeşitlilik göstermiştir, bu farelerin karşılaştırılabilir miktarlarda enzim almış olduğunu gösterir. Enzim, 20 dakika 'dan daha az olan bir yarı ömür ile dolaşımdan temizlenmiştir. Fareler enjeksiyondan 2, 4 ve 10 saat sonra öldürülmüştür ve organ ekstraktları, LAMAN aktivitesinin ve nötral oligosakkaritlerin belirlenmesi için hazırlanmıştır. Organlarda LAMAN'ın maksimum aktivitesi, enjeksiyondan 2-4 saat sonra gözlenmiştir (Tablo 1). Karaciğerde, aktivite kontrol farelerinde olana kıyasla 6-7 kat daha yüksektir, ancak ayrıca dalakta ve kalpte de maksimum değerler kontrollerinkileri aşmıştır. Böbrekte, maksimum, kontrol farelerindeki aktivitenin dörtte birine ulaşılmıştır. Beyinde görülen küçük aktivite büyük olasılıkla, vasküler sistemde bulunan LAMAN'dan kaynaklanır. Enjeksiyondan 4 ve 10 saat sonra aralığında, enzim aktivitesi karaciğer, dalakta ve böbrekte yaklaşık 3 saat olan bir görünür yarı ömür ile çabucak düşmüştür. Western blot, LAMAN'ın içselleştirilmiş öncülünün matür formlara (gösterilmemiştir) çabucak işlendiğini göstermiştir.

α -mannosidozun özelliği, çok çeşitli dokularda nötral oligosakkaritlerin depolanmasıdır (bakınız, Şekil 2, sütun 1 ve 2). Bu oligosakkaritler, bunların indirgeme ucunda 2-9 mannoz rezidüsü ve bir N-asetilglukozamin rezidüsü içerir ve bundan dolayı, bir endoglukozaminidazından etkisinden kaynaklanır. Karaciğerde ve dalakta nötral oligosakkaritlerin miktarı zamanla progresif olarak, sahte-enjekte edilmiş hayvanlarda olanın %15'ine ve %7'sine düşmüşken, böbrekte ve kalpte depolama yalnızca yaklaşık %49'una ve %74'üne düşürülmüştür (Şekil 2).

- 10 **TABLO 1:** Vücut ağırlığının her bir g'ı için 100 mU fare LAMAN'ı enjeksiyonundan önce ve sonra kontrol ve α -mannosidoz farelerinin doku ekstraktlarında LAMAN aktivitesi. *+/, kontrol farelerini, -/-, α -mannosidoz fareleri ve n, araştırılan hayvanların sayısını ifade eder. *Tüm değerler, $t_{sıfır}$ 'da (2350 mU/ml serum) serumda ortalama α -mannosidaz aktivitesi için düzeltilmiştir. Düzeltme faktörleri, 2, 4 ve 10 saat için
- 15 sırasıyla, 0,98'dir, 1,07'dir ve 0,96'dir.

Genotip	Enjekte edilmiş LAMAN (100mU/g vücut ağırlığı)	LAMAN (mU/g ıslak ağırlık)				
		Karaciğer	Dalak	Böbrek	Kalp	Beyin
(+/+)* (n)	-	136,7±29,1 (19)	116,3±44,5 (3)	168,4±34,5 (9)	12,6±3,1 (3)	25±1 (2)
(-/-)* (n)	-	2,9±2,5 (21)	2,8±2,1 (4)	2,5±1,1 (10)	0,6±0,5 (3)	0,4±0,3 (3)
	2 sa ⁺	1057	185	26	22	2,9
	4 sa ⁺	883	183	40	5	1,4
	10 sa ⁺	197	36	10	2	1,0

- 20 LAMAN'ın bir tek dozunun düzeltici etkisinin ne kadar sürdüğünü belirlemek için, fareler vücut ağırlığının her bir g'ı için 100 mU fare LAMAN'ının enjeksiyonundan 4, 8 ve 16 gün sonra incelenmiştir. Tüm zaman noktalarında, organlardaki (dalak, böbrek, kalp,

beyin) LAMAN aktivitesi, burada enjeksiyondan 4 gün sonra LAMAN aktivitesinin (15,1 mU/g ıslak ağırlık) sahte-enjekte edilmiş farelerde olana kıyasla hâlâ yaklaşık 5-kat daha yüksek olduğu karaciğer dışında, muamele edilmemiş veya sahte-enjekte edilmiş α -mannosidoz fareleri aralığı içindedir. Karaciğerde, dalakta ve böbrekte enjeksiyondan 4 gün sonra nötral oligosakkaritlerin depolanması enjeksiyondan 10 saat sonra görülen aralık içindedir (Şekil 2'yi ve Şekil 3'ü karşılaştırın). Kalpte, depolama, 10 saat sonra %74'ten 4 gün sonra %42'ye düşmüştür. Bu, organlarda, örneğin, böbrekte veya kalpte, enjeksiyondan 10 saat sonra çok az LAMAN aktivitesinin saptanabildiği veya hiç LAMAN aktivitesinin saptanamadığı gerçeğine rağmen, 10 saat sonra görülen düzeltici etkinin yaklaşık 4 gün boyunca sürdüğünü gösterir. 4 gün sonra, oligosakkaritlerin depolanması yeniden net bir şekilde yükselmeye başlamıştır. Enjeksiyondan sonraki gün 4 ila gün 16 arasında gözlenen artış, sahte-enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinde görülen depolamanın %20-40'ına karşılık gelir (Şekil 3).

15 **Bovin, fare ve insan LAMAN'ının klirensinin ve düzeltici etkisinin karşılaştırılması**

Üç kaynaktan LAMAN preparasyonlarının düzeltici etkisini karşılaştırmak için, farelere, LAMAN'ın bir parsiyel düzelme sağlaması beklenen bir dozu enjekte edilmiştir. Böylelikle, vücut ağırlığının her bir g'ı için 50 mU LAMAN enjekte ettik. Bovin ve insan LAMAN'ı sırasıyla 4 dakika ve 8 dakika olan yarı ömürler ile dolaşımdan çabucak temizlenmiştir (Şekil 4). Hayli fosforile edilmiş fare LAMAN'ının klirensi daha yavaştır ve en azından bifaziktir. Enzimin yaklaşık %85'i, 12 dakika olan bir görünür yarı ömür ile temizlenirken, kalan fraksiyonun görünür klirensi yaklaşık 47 dakika 'dır (Şekil 4).

25 Fareler, enjeksiyondan 2 gün sonra öldürülmüştür ve karaciğerden, dalaktan, böbrekten ve kalpten elde edilen ekstraktlar nötral oligosakkaritler için incelenmiştir (Şekil 5). Karaciğer dışında, düzeltici etki insan LAMAN'ı için en yüksektir ve bovin LAMAN'ı için en düşüktür. Fare enziminin düzeltici etkisi aradadır. Yalnızca karaciğerde, bovin enziminin düzeltici etkisi (kalan depolamanın %4'ü) insan enziminkine (kalan depolamanın %14'ü) kıyasla daha çok belirgindir. Karaciğerde, insan LAMAN'ının düzeltici etkisi, en zayıftır (kalan depolamanın %23'ü).

Yüksek dozda insan LAMAN'ının düzeltici etkisi

Bovin, fare ve insan LAMAN'ının karşılaştırması, zayıf bir şekilde fosforile edilmiş insan LAMAN'ının, böbrekte ve kalpte, karaciğere ve dalağa kıyasla metabolik düzeltmeye daha çok dirençli olan iki organda, görece daha yüksek bir düzeltici potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. İnsan enziminin düzeltici potansiyelini değerlendirmek için, 250 mU LAMAN'ın bir tek dozunu enjekte ettik ve fareleri enjeksiyondan 1 ila 12 gün sonra analiz ettik. Karaciğerde, depolama enjeksiyondan 1 ve 3 gün sonra tam olarak düzeltilmiştir. 6 ve 12 gün sonra, nötral oligosakkaritler, yeniden birikmeye başlamıştır, ancak tedaviden önceki depolama düzeyinin yalnızca yaklaşık %30'una ulaşmıştır (Şekil 6). Karaciğerin ışık mikroskobu ile incelenmesi, muamele-edilmemiş α -mannosidoz farelerinin sinüs endotelyal hücrelerinde, Kupffer hücrelerinde hepatositlerinde göze çarpan depolama kofullarının neredeyse tamamen kayb olduğunu ve enjeksiyondan 12 gün sonra yeniden-görüldüğünü ortaya çıkarmıştır (Şekil 7). Dalakta ve böbrekte, nötral oligosakkaritlerin depolanması sırasıyla %12'ye ve %18'e düşmüştür. Dalakta ve böbrekte maksimum düzeltmenin sırasıyla 3 ve 6 gün sonra gözlenmesi kayda değerdir. Her iki organda, nötral oligosakkaritler enjeksiyondan 3 ve 6 gün sonra yeniden-birikmeye başlamıştır (bakınız, Şekil 5). α -mannosidoz farelerinin beyindeki nötral oligosakkaritler, tedaviden etkilenmemiştir (gösterilmemiştir).

Enjeksiyondan 24 saat sonra geri-kazanılan insan LAMAN'ı aktiviteleri, fare LAMAN'ı ile yapılan deneylerden beklenene kıyasla çok daha yüksektir. Karaciğerde, insan LAMAN'ı aktivitesi, kontrol karaciğerine kıyasla hâlâ 6 kat daha yüksektir. Dalakta ve böbrekte, bu, kontrolünün %10-15'ine tekabül etmiştir. İnsan enziminin alımını ve kararlılığını izlemek için, LAMAN aktivitesi, vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ının enjeksiyonundan 4, 16 ve 24 saat sonra hazırlanan doku ekstraktlarında belirlenmiştir. Enjekte edilmiş LAMAN'ın %20'sinden daha azı, incelenen dokuda 4 saat sonra geri-kazanılmıştır (karaciğerde %18, böbrekte %0,4, dalakta %0,12 ve kalpte %0,04). Fare LAMAN'ının alımı ile karşılaştırıldığında ve insan LAMAN'ının bir 2,5 kat daha yüksek olan miktarının enjekte edildiği hesaba katıldığında, enjeksiyondan 4 saat sonra karaciğerde, böbrekte ve kalpte geri-kazanılan aktivite her iki enzim preparasyonu için karşılaştırılabilir (Tablo 1'i ve Tablo 2'yi karşılaştırın). Dalak tarafından alımın, insan enzimi için 2-3 kat daha az etkili olduğu görülmüştür. İnsan ve fare enzimi arasındaki en büyük farklılık, karaciğer, böbrek ve dalak tarafından içselleştirilen insan LAMAN'ının daha yüksek kararlılığıdır. İnsan LAMAN'ının aktivitesi bu organlarda 24 saat sonra 4 saat sonraki değerinin %17-

33'üne düşerken (bakınız, Tablo 2), fare enzimininki hâlihazırda 10 saat sonra 4 saat sonraki değerin %20-26'sına düşmüştür (bakınız, Tablo 1).

Fare (bakınız, Şekil 3) ve insan LAMAN'ının düzeltici etkisi yalnızca geçicidir. Nötral oligosakkaritler, enjeksiyondan 3 ila 6 gün sonra yeniden-birikmeye başlamıştır. Enjekte edilmiş enzimin miktarını artırma, yeniden-birikmeyi geciktirmek için bir araç olacaktır. LAMAN'ın verilen bir dozunun düzeltici etkisinin, bir tek doz olarak uygulanmasına kıyasla bir uygun aralıkla ayrılmış iki yarım doz olarak uygulandığında daha yüksek olması beklenir. LAMAN'ın miktarını 500 mU/g vücut ağırlığı'na arttırmaktan ziyade, analizden önce gün 7'nin ve 3,5'in her birinde vücut ağırlığının her bir g'ı için iki kere 250 mU insan LAMAN'ı uyguladık. Bu, böbrekte ve kalpte depolamanın bir tam düzeltilmesi ile sonuçlanmıştır (Şekil 8). Işık mikroskobu ile inceleme, karaciğerde (gösterilmemiştir) ve böbreğin tübüler epitelyumlarında depolama kofullarının olmadığını göstermiştir (Şekil 9). Dalaktaki rezidüel depolama, sahte-enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerindeki %20'sinden daha azdır. En göze çarpan şekilde, beyinde TLC ile kantifiye edildiği üzere nötral oligosakkaritlerin düzeyi, sahte-enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinin beynindeki yalnızca yarısıdır (Şekil 8).

TABLO 2: Vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan α -mannosidozu enjeksiyonundan 4-24 saat sonra α -mannosidoz farelerinin doku ekstraktlarında LAMAN aktivitesi. *Tüm değerler, $t_{sıfır}$ 'da (5012 mU/ml serum) serumda ortalama LAMAN aktivitesi için düzeltilmiştir. Düzeltme faktörleri, 0,903 ve 1,222 aralığında çeşitlilik göstermiştir. Kontrol farelerinin ve enjekte edilmemiş farelerin doku ekstraktlarında LAMAN aktivitesi için, bakınız Tablo 1.

Enjeksiyondan sonraki saatler	LAMAN (mU/g ıslak ağırlık)*				
	Karaciğer	Dalak	Böbrek	Kalp	Beyin
4	2774	157	81	21	2,1
8	2639	65	45	8	1,7
16	1549	31	26	10	2,7
24	796	24	16	6	3,0

Bir molar temele nötral oligosakkaritleri kantifiye etmek için, sahte- ve LAMAN enjekte edilmiş α -mannosidoz farelerinin beyninden ekstrakte edilen nötral oligosakkaritler, oligosakkaritlerin indirgeme uçlarına bir flüoresan etiket uygulayan 2-antranilamid ile reaksiyona sokulmuştur. Flüoresan olarak etiketlenmiş oligosakkaritler, HPLC ile ayrılmıştır ve 2-antranilamid ile türevlendirmeden önce eklenen bir iç standart oligosakkarit ile karşılaştırma ile kantifiye edilmiştir (Şekil 10). α -mannosidoz farelerin beyindeki majör oligosakkarit türleri, 2, 3 veya 4 mannoz rezidüsü içerir. Bunlar sırasıyla 319, 87 ve 164 pmol/g olan konsantrasyonlarda bulunur ve beyindeki tüm nötral oligosakkaritlerin %61'ine tekabül eder. Muamele edilmiş α -mannosidoz farelerinin beyinde, nötral oligosakkaritlerin konsantrasyonu, sahte-enjekte edilmiş farelerin %26'sına düşmüştür. Düzeltici etki, oligosakkarit türlerinin her biri için bildirilmiştir, ancak 9, 7 ve 4 mannoz rezidüsü olan türler için görece en yüksektir (bakınız, Şekil 10).

Mevcut çalışmada, bovin böbreğinden saflaştırılmış LAMAN kullanılmıştır. Bu enzim preparasyonu, bir düşük mannoz 6-fosfat içeriği olan matür polipeptitlerden oluşmuştur. CHO hücrelerinin salgısından izole edilen rekombinant insan LAMAN'ı ağırlıklı olarak, öncül formdan oluşmuştur, ancak ayrıca zayıf bir şekilde fosforile edilmiştir. Bu preparasyonun düşük mannoz 6-fosfat içeriği büyük olasılıkla, izolasyon sırasındaki defosforilasyondan kaynaklanır. Arada sırada, en fazla %40'ı MRP 300 kolonuna bağlanmış insan LAMAN'ı preparasyonları elde edilmiştir (C. Andersson, D. P. Roces, yayımlanmamış gözlem). Mannoz 6-fosfat reseptörlerinden yoksun olan fare embriyonik fibroblastlarının salgılarından saflaştırılan rekombinant fare LAMAN'ı büyük oranda fosforile edilmiştir ve öncül form ile temsil edilmiştir. Dolaşımdaki klirens, hayli fosforile edilmiş fare LAMAN'ı için olana kıyasla bovin böbreğinden ve CHO hücrelerinden elde edilen iki zayıf bir şekilde fosforile edilmiş LAMAN preparasyonu için daha hızlıdır. Farklı LAMAN preparasyonlarının organlar tarafından alımı doğrudan karşılaştırılmamıştır. Bununla birlikte, farklı deneylerin verilerini karşılaştırma, zayıf bir şekilde fosforile edilmiş insan ve zayıf bir şekilde fosforile edilmiş fare LAMAN'ının benzer fraksiyonlarının karaciğer, böbrek ve kalp tarafından alındığını öne sürer. Yalnızca dalakta, alım farklıdır ve daha yüksek fosforilasyon ile kolaylaştırılmıştır. Farelerde fosforile edilmiş ve fosforile edilmemiş β -glukuronidaz alımı konusundaki ilgili bir çalışmada, karaciğere ve dalağa alım için farklılık gözlenmemişken, böbreğe ve kalbe alım fosforile edilmiş enzim için daha yüksektir (26). Glikosilasyon ve

fosforilasyon açısından farklı olan α -galaktosidaz preparasyonları için, karaciğer, dalak ve böbrek tarafından benzer bir alım gözlenmiştir (27). Bu, glikosilasyonun ve fosforilasyonun lizozomal enzimlerin farklı organlara alımı üzerindeki etkisinin enzime bağlı olduğunu gösterir.

5

Farklı kaynaklardan elde edilen LAMAN preparasyonları arasındaki bir majör farklılık, bunların kararlılığıdır. Birinci derece kinetikler varsayılarak, fare (bakınız, Tablo 1) ve bovin (gösterilmemiştir) LAMAN'ının aktivitesi 3 saat veya daha az olan bir görünür yarı ömür ile karaciğerde, böbrekte ve dalakta düşmüşken, insan LAMAN'ının görünür yarı ömrü 3 kattan daha fazla uzundur. Bu, dalakta, böbrekte ve kalpte insan LAMAN'ının oligosakkarit depolanması üzerindeki daha yüksek düzeltici etkinliğini açıklayabilir (bakınız, Şekil 5).

LAMAN'ın bir tek intravenöz enjeksiyonu, enzimin kaynağına bakılmaksızın nötral oligosakkaritlerin lizozomal depolanmasının bir çabuk ve belirgin düşüşüne yol açmıştır. Düzeltici etki, karaciğerde en çok belirgindir. Bu ayrıca, burada doğal tip farelerde olana kıyasla LAMAN aktivitesinin artışının en yüksek olduğu dokudur. Histolojik inceleme, hem parankimal olan hem de parankimal-olmayan karaciğer hücrelerinde depolamanın bir düzelmesini ortaya çıkarmıştır. Bu, hayli fosforile edilmiş fare LAMAN'ı için (gösterilmemiştir) ve zayıf bir şekilde fosforile edilmiş insan LAMAN'ı için (bakınız, Şekil 7) doğrudur. Bu, β -glukuronidaz ile yapılan daha erken bir çalışma fosforile edilmemiş enzim formlarının neredeyse özellikle parankimal-olmayan karaciğer hücrelerine lokalize olurken, fosforile edilmiş formların hem parankimal olan hem de parankimal-olmayan hücrelere lokalize olduğunu gösterdiğinden, beklenmedik bir durumdur (26). LAMAN'ın düzeltici etkisi, tüm dokularda geçicidir. Nötral oligosakkaritler, enjeksiyondan 2 ila 6 gün sonra yeniden-birikmeye başlamıştır.

Depolamanın göze çarpan bir düzelmesi, dalakta ve böbrekte depolamayı %80-90 azaltan, vücut ağırlığının her bir g'ı için 250 mU insan LAMAN'ının enjeksiyonu 3,5 günde tekrarlandığında gözlenmiştir. Bir hafta içinde, depolama yalnızca karaciğerde değil aynı zamanda böbrekte ve kalpte de kaybolmuştur. Daha önemlisi, nötral oligosakkaritlerin konsantrasyonu ayrıca, beyinde yaklaşık dörtte birine de düşmüştür. Son bahsedilen durum, nöral hücrelere bir LAMAN alımına atfedilemez. Farelerde, kan-beyin bariyeri, yaşamın ilk iki haftası içinde olgunlaşır ve bu periyottan sonra intravenöz olarak uygulanan lizozomal enzimler kan-beyin bariyerini geçmez (28-31). Bu

gözlemlere uygun şekilde, muamele edilmiş farelerin beyin homojenatlarında iz miktarlarda LAMAN gözlemledik (bakınız, Tablo 1 ve 2). Bu aktiviteler, ekstra-nöral hücrelere, örneğin, endotelyumlara, koroid pleksus epitelyumuna ve tam olmayan bir şekilde çıkarılmış meninkslere, atfedilir. Uygulanan LAMAN'ın nöronal ve gliyal hücrelerde depolanan oligosakkaritlere erişim sağlaması olası olmadığından, alternatif mekanizmalar düşünülmelidir. Kan dolaşımı yoluyla veya serebrospinal sıvının bir iyileştirilmiş akışı yoluyla oligosakkaritlerin klirensi, beyinde nötral oligosakkarit depolanmasının azaltılmasına katkı sağlayabilir.

10 **Örnek 3: rhLAMAN - α -mannosidoz farelerde tekrarlı doz replasman terapisinin etkinliği**

Çalışmanın amacı aşağıdakilerdir

- 15 - Tüm periferik dokularda mannoz oligosakkaritleri depolanmasının bir toplam düzeltilmesini göstermek ve beyinde depolamanın düzeltilmesini doğrulamak.
- rhLAMAN'ın bir tekrarlı dozunun enjeksiyonunun ayrıca farklı periferik dokularda ölçülen LAMAN aktiviteleri üzerinde de bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek.
- 20 - Tekrarlı enjeksiyonlardan sonra antikorların gelişimini izlemek ve bunların enzimi çökeltip çökeltmediğini kontrol etmek. Fare antikorlar geliştirdiğinde, bunların enzimin klirensi üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek.
- Antikorların bir arttırılmış düzeyinin kan beyin bariyerinin (BBB) geçirgenliği üzerinde bir etkiye sahip olup olmadığını belirlemek.
- 25 - 1 ve 4 haftalık tedaviden sonra, nakavt, enjekte edilmiş nakavt ve doğal tip farelerin gen ekspresyonunu karşılaştırmak. Karaciğerden elde edilen RNA ile bir mikro-dizilim deneyi gerçekleştirilecektir. Bu deney için kullanılan fareler, heterozigot beslemelerden seçilir (aşağıya bakınız).

30 **Test sisteminin doğrulanması**

Test maddesi

Test maddesi, bir 5,4 mg.ml⁻¹ çözelti (8,2 U/mg, seri 041202) olarak sağlanır ve sağlandığı şekilde kullanılır. Test maddesi, kullanılmadığında dispanserde dondurulur (yaklaşık -20°C).

5 Hayvanlar ve yönetim

Deney için farelerin 5 farklı grubu kullanılır:

(-/-)	α -mannosidoz fareler
(+/+)	C57/B6 (doğal tip fareler)
(+/-)	α -mannosidoz fareleri (-/-) ve C57/B6 fareleri (+/-) arasında bir çaprazlamanın yavruları olan heterozigot fareler
(-/-)	heterozigot çaprazlamalardan (+/- fareler) α -mannosidoz fareler
(+/+)	heterozyigot çaprazlamalardan (+/- fareler) doğal tip fareler
Yaş:	Çalışmanın başlangıcında 8 haftalık.
Hayvanların sayısı:	64 (erkek ve/veya dişi) fare
Sağlık durumu:	Hastalıklı olduğundan şüphe edilen hayvanlar çalışmadan çıkarılmıştır. Anlamlı sayıda hayvan uygun olmadığında, hayvanların tüm serisi reddedilir ve yeni bir seri elde edilir.
Aklimatizasyon:	Hayvanların, dozlamadan başlamasından önce minimum 3 gün boyunca kaldıkları yere alışmasına izin verilir.

- 10 Doz Gruplarına Dağıtma: Tüm hayvanlar tartılmıştır ve gerekli sayıda hayvan 5 doz grubuna rastgele tayin edilmiştir. Doz ağırlığa göre ayarlandığından ve bu güne kadar cinsiyet-spesifik farklılıklar bulunmadığından, bir ağırlık ve/veya cinsiyet stratifikasyonu gerekli değildir. Gen ekspresyonu çalışmalarında, cinsiyet sıklıkla bir ilgili faktör olarak tarif edildiğinden, Mikro-dizilim deneyinde yalnızca erkekler kullanılır (gruplar 2*, 4* ve 5*, aşağıya bakınız).
- 15

Oda Ortamı: Hayvanlar, paslanmaz çelik elek tavanları ve yatak materyali olarak tahta talaşlar bulunan katı tabanları olan bir polipropilen kafes içinde 4/kafes veya 8/kafes

şeklinde barındırılır. Kafesler (267 x 207 x 104 mm veya 425 x 266 x 188 mm) gerektiğinde değiştirilir.

5 Kafeslere, bir paslanmaz çelik ibrik ağzı ve başlığı olan bir polikarbonat su şişesi (kapasitesi 250 ml) sağlanır. Su şişeleri gerektiğinde doldurulur ve haftada en az bir kere değiştirilir/yıkanır.

10 Otomatik sıcaklık ve nem kontrolü vardır, hedef aralıklar, her bir saat için minimum 15 hava değişimi vermesi amaçlanan bir oda hava akımı ile, sırasıyla, $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'dir ve $\%50 \pm \%15$ 'tir. Sıcaklık ve nem aralıkları izlenir ve günlük olarak kaydedilir. Otomatik ışık siklusu kontrolü vardır, aydınlık saatler normal olarak, 06.00-18.00'dır.

Diyet ve Su Tedariki

15 Besin ve su hayvanlar arzu ettiklerinde kullanabilecekleri şekilde mevcuttur. Besinin ve suyun, çalışmanın sonucu üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmaya yetecek konsantrasyonda herhangi bir ilave madde içerdiği düşünülmemektedir.

Tedavi (Muamele)

20

Doz Grupları/Doz Düzeyi

25 Grup 1 (biyokimya araştırmaları için, 16 LAMAN fare). Farelere bir haftada iki kere intravenöz olarak 250 mU/g vücut ağırlığı rhLAMAN ile muamele edilmiştir ve 4 farelik grup 1, 2 ve 4 haftalık tedaviden sonra öldürülür.

30 Grup 2*ye (mikro-dizilim araştırmaları için, heterozigot çaprazlamadan 8 LAMAN fareye) bir haftada iki kere intravenöz olarak 250 mU/g vücut ağırlığı rhLAMAN ile muamele edilmiştir ve 3 farelik grup 1 ve 4 haftalık tedaviden sonra öldürülür.

35 Grup 3'e (kan-beyin bariyeri, Antikor ve plazma klirensi araştırmaları için, 12 LAMAN fareye) haftada bir kere 250 mU/g vücut ağırlığı rhLAMAN ile muamele edilmiştir. Farelerin her iki grubu, BBB araştırmaları için kullanılan 4 fare ve klirens araştırması için kullanılan 4 fare 4 haftalık tedaviden sonra öldürülür.

Grup 4'e (Sahte muamele edilmiş fareler, 12 LAMAN fareye) Grup 3'te/Grup 1'de muamele edilen hayvanlar ile aynı doz hacminde rhLAMAN için vehikül ile haftada bir ere/iki kere muamele edilir. 4 farelik bir gruba haftada bir kere enjekte edilir ve bunlar (grup 3'ten fareler ile karşılaştırılması için) 4 haftalık tedaviden sonra öldürülür ve 2 farelik gruplar (grup 1 ile karşılaştırılması için) 1, 2 ve 4 haftalık tedaviden sonra öldürülür.

Grup 4**e (Sahte muamele edilmiş fareler, heterozigot çaprazlamadan 8 LAMAN fareye) ve Grup 5**e (heterozigot çaprazlamadan 8 doğal fareye), Grup 2**de muamele edilen hayvanlar ile aynı doz hacminde rhLAMAN için vehikül ile bir haftada iki kere muamele edilir. 3 farelik grup, 1 ve 4 hafta sonra öldürülür.

*Heterozigot beslemelerden (+/-), α -mannosidoz fareler (-/-) ve doğal tip C57/B6 (+/+) arasında bir beslemenin yavrularından, α -Mannosidoz fareler.

TABLO 3: Hayvanların doz gruplarına dağıtılması:

Hayvanlar		LAMAN nakavt fareler (LAMAN enjekte edilmiş)						Enjeksiyonların sayısı
Grup No		1A	1C	2A*	2B*	3A	3B	
Tedavi süresi	Öldürme zamanları				Mikro-dizilim	Evans Blue	Ab-fareler	
ila		36x	+	+	+	+	+	36x
t _{0,5w}		24x	+	+	+			24x
t _{1w}	t _{1w}	29x	+	+	3*	+	+	29x
t _{1,5w}		17x	+	+		+		17x
t _{2w}	t _{2w}	25x	4	+		+	+	25x
t _{2,5w}		13x		+		+		13x
t _{3w}		25x		+		+	+	25x
t _{3,5w}		13x		+		+		13x
t _{4w}	t _{4w}	-		4		3*	4	-

Hayvanlar		LAMAN nakavt fareler (LAMAN enjekte edilmiş)						Enjeksiyonların sayısı
Grup No		1A	1C	2A*	2B*	3A	3B	
Tedavi süresi	Öldürme zamanları				Mikro-dizilim	Evans Blue	Ab-fareler	
No		4	4	3	3	4	4	
Ayırma			+4		+2		+4	

TABLO 3: Hayvanların doz gruplarına dağıtılması (devamı)

Hayvanlar		LAMAN nakavt fareler						Doğal Tip fareler	Enjeksiyonların sayısı
Grup No		4A	4B	4C	4D	4E*	4F*	5A*	5B*
Tedavi süresi	Öldürme zamanları	Kontrol Sahte Muamele edilmiş						Kontrol Sahte Muamele edilmiş	
ila		+	+	+	+	+	+	+	36x
t _{0,5w}		+	+	+		+	+	+	24x
t _{1w}	t _{1w}	2	+	+	+	3*	+	3*	29x
t _{1,5w}			+	+			+		17x
t _{2w}	t _{2w}	2	+	+			+		25x
t _{2,5w}				+			+		13x
t _{3w}				+	+		+		25x
t _{3,5w}				+			+		13x
t _{4w}	t _{4w}			2	4		3*		3*
No		2	2	4	2	3	3	3	-

Hayvanlar		LAMAM nakavt fareler						Doğal Tip fareler	Enjeksiyonların sayısı
Grup No		4A	4B	4C	4D	4E*	4F*	5A*	5B*
Tedavi süresi	Öldürme zamanları	Kontrol Sahte Muamele edilmiş						Kontrol Sahte Muamele edilmiş	
Ayırma								+4	+2

Uygulama Yolu, Süresi ve Yöntemi

Test maddesi, hedef doz düzeylerinde lateral kuyruk venlerinin birine bir intravenöz (bolus) enjeksiyon yoluyla uygulanır. Zorunlu doz hacmi, hayvanların en güncel
5 kaydedilmiş vücut ağırlığına göre hesaplanır.

Uygulamadan önce, farelere vücut ağırlığının her bir 100 g'ı için bir 10 mg/ml Ketavet (Parke Davis) ve 2 mg/ml Rompun (Bayer) çözeltisinin 75 µl'si ile anestezi uygulanır (intra-peritoneal) ve fareler anesteziden derlenene kadar 37°C'de tutulur.

10

Gözlemler

Viabilite

15 Tüm hayvanlar viabilite için her gün sabah erkenden ve mümkün olduğu kadar geç kontrol edilir. Şiddeti güçsüzlük veya intoksikasyon bulguları gösteren ve bir can çekişme hâlinde olduğu düşünülen herhangi bir hayvan öldürülür. Ölmek üzereyken öldürülen veya ölü bulunan herhangi bir hayvan, mümkün olduğunda, ölüm gününde bir makroskopik post mortem incelemeye tabi tutulur. Ölüm gününde makroskopik post
20 mortem inceleme yapmak uygulanabilir olmadığında (örn., geç öğleden sonra veya hafta sonları), karkas bir polietilen poşet içine yerleştirilir ve sonraki gün incelemeye kadar bir buzdolabında (4°C) tutulur.

Klinik Bulgular

25

Tüm hayvanlar tedaviye reaksiyon için dozlama günlerinde gözlenir. Herhangi bir bulgunun başlaması, yoğunluğu ve süresi gözlenir ve kaydedilir.

Vücut Ağırlığı

5

Dozlamadan önce tüm hayvanlar haftalık olarak tartılır ve kaydedilir ve tablo hâline getirilir.

Laboratuvar araştırmaları

10

Tedavi doğrulaması

15

Enjeksiyondan beş dakika sonra, (iç prosedür no 2'ye göre) rhLAMAN plazma düzeylerinin ölçülmesi için retroorbital pleksustan kan alınır. Bir hayvan tam doz almadığında, eksik miktarın %'si hesaplanır ve aynı gün hayvana verilir.

Kinetikler

20

Grup 3'ten 4 fareden, enjeksiyondan bir gün önce ve ayrıca Ab'nin enzimin klirensi üzerindeki olası bir etkisini araştırmak için her bir enjeksiyondan 5, 15 ve 30 dakika sonra retroorbital pleksustan kan alınır.

25

Enzim çalışmanın sonunda (4 hafta) hâlâ mevcut olduğunda, bu farelerin tedavisi 8 haftaya kadar devam edecektir.

Antikor belirlenmesi

30

Dozlamadan önce, antikor titrelerini ölçmek için grup 2 hayvanlarından aynı zamanda çalışma sonlandığında diğer tüm hayvanlardan retroorbital pleksustan kan alınır.

Terminal çalışmalar

Öldürme yöntemi

Farelere, 0,15 M NaCl içindeki bir 10 mg/ml Ketavet (Parke Davis) ve 2 mg/ml Rompun (Bayer) çözeltisinin 600 µl'si ile anestezi uygulanır, fareler PBS ile perfüze edilir ve kanatma ile öldürülür.

- 5 Grup 3 dışındaki tüm gruplar için, öldürme son tedaviden üç buçuk gün sonra gerçekleşir. Grup 3 için, fareler son tedaviden 1 hafta sonra öldürülür (bakınız, Tablo 3).

Histopatoloji

10

Aşağıdaki organlar toplanır ve pH 7,4'e tamponlanmış 0,1 mM NaPi/%6 Gluteraldehit ile fikse edilir: karaciğer, böbrek, beyin.

15

Jilet ile küçük kesitlere kesilir ve fikse edilmiş lamalar elektron mikroskobu analizine tabi tutulur.

Doku LAMAN konsantrasyonları

20

TBS/PI (Proteaz İnhibitörleri) içindeki Karaciğer, Dalak, böbrek, kalp ve beyin homojenatları, substrat olarak p-nitrofenil- α -mannopiranosit ve tampon olarak 0,2 M sodyum sitrat, pH 4,6, %0,08 NaN₃, %0,4 BSA kullanılarak LAMAN aktivitesi için ölçülür.

25

LAMAN'ın işlenmesi Western Blot ile izlenir (~1mU gereklidir).

Doku Oligosakkaritleri

30

10.3'te tarif edilen organlardan, Prosedür no 4'e ve 5'e göre TLC ile organlardaki depolamanın normalizasyonunu çalışmak için nötral oligosakkaritlerin ekstraktlarının bir preparasyonu hazırlanır ve dansitometri ile kantifiye edilir.

Karaciğerden ve kalpten elde edilen nötral oligosakkaritler, glikojen girişiminden kaçınmak için, α -glukosidaz ile sindirilecektir.

35

Sonuçların istatistiksel analizi

Aksi ifade edilmedikçe, tüm istatistiksel testler iki-taraflıdır ve kurum-içi yazılım kullanılarak %5 anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilir.

5 Aşağıdaki ikili karşılaştırmalar yapılır:

- Grup 1A'ya karşı Vehikül Kontrol Grubu 4A
- Grup 1B'ye karşı Vehikül Kontrol Grubu 4B
- Grup 1C'ye karşı Vehikül Kontrol Grubu 4C
- 10 Grup 3A'ya karşı Vehikül Kontrol Grubu 4D
- Grup 4E*a, 4F*a karşı Vehikül Kontrol Grubu 5A*, 5B*
- Grup 2A*a, 2B*a karşı Vehikül Kontrol Grubu 5A*, 5B*
- Grup 2A*a, 2B*a karşı Vehikül Kontrol Grubu 4E*, 4F*

- 15 Veriler, Shapiro-Wilk testi ve dağılım-dağılım-eğrileri kullanılarak dağılımın normalitesi için analiz edilir. Bir normal dağılım varsayılabildiğinde, gruplar arasındaki farklılıklar aynı-serpilimsellik varsayımı ile veya aynı-serpilimsellik varsayımı olmadan lineer modeller (ANOVA) kullanılması için test edilir. Veriler (veya log'a dönüştürülmüş veriler) normal olarak dağılmadığında, bir Kruskal-Wallis-Test'i kullanılır. İlave veri analizi
- 20 adımları, verilere bağlı olarak yapılabilir.

(* heterozigot beslemeler, aşağıya bakınız)

25 **REFERANSLAR**

1. Ockerman, P. A. (1967) A generalized storage disorder resembling Hurler's syndrome. Lancet 2, 239-241
2. Hocking, J.D., Jolly, R.D., and Blatt R.D. (1972) Deficiency of α -mannosidase in
- 30 Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease. Biochem. J. 128, 69-78
3. Burditt, L.J., Chtai, K., Hirani, S., Nugent, P.G., Winchester, B. and Blakmore, W.F. (1980) Biochemical studies on a case of feline mannosidosis. Biochem. J. 189, 467-473
4. Hirsch, C., Blom, D. and Ploegh, H.L. (2003) A role for N-glycanase in the cytosolic
- 35 turnover of glycoproteins. EMBO J. 22, 1036-1046.

5. Saint-Pol, A., Cordogno, P. and Moore, S.E.H. (1999) Cytosol to lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 274, 13547-13555
6. Thomas, G.H. (2001) Disorders of glycoprotein degradation: α -mannosidosis, β -mannosidosis, fucosidosis and sialidosis in "The Metabolic Bases of Inherited Disease (Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., Vogelstein, B., eds.) 8th ed., pp. 3507-3533, McGraw-Hill, New York
7. Berg, T., Riise, H.M., Hanse, G.M., Malm, D., Tranebjarg, L., Tollersrud, O.K. and Nilssen, O. (1999) Spectrum of mutations in α -mannosidosis. *Am J. Hum. Genet.* 64, 77-88
- 10 8. Neufeld, E.F. (2004) Enzyme replacement therapy. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley, S.V., eds.) pp. 327-338, Oxford University Press
9. Dobrenis, K. (2004) Cell-mediated delivery systems. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley, S.V., eds.) pp. 339-380, Oxford University Press
10. Barton, N.W., Brady, R.O., Dambrosia, J.M., Di Bisceglie, A.M., Doppelt, S.H., Hill, S.C., Mankin, H.J., Murray, G.J., Parker, R.I., Argoff, C.E., Grewal, R.P., Yu, K.-T. et al. (1991) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N. Engl. J. Med.* 324, 1464-1470
- 15 11. Will, A., Cooper, A., Hatton, C., Sardhwalla, I.B., Evans, D.I.K. and Stevens, R.F. (1987) Bone marrow transplantation in the treatment of α -mannosidosis. *Arch. Dis. Childhood* 62, 1044-1049
- 20 12. Wall, D.A., Grange, D.K., Goulding, P., Danies, M., Luisiri, A. and Kotagal, S. (1998) Bone marrow transplantation for the treatment of α -mannosidase. *J. Pediatr.* 133, 282-285
13. Malm, P. (2004) Prologue. The doctor as parent. In "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F.M., Walkley S.U., eds.) pp. XXI-XXVII, Oxford University Press
- 25 14. Walkley, S.U., Thual, M.A., Dobrenis, K., Huang, M., March, .A., Siegel, D.A. and Wurzelmann, S. (1994) Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2970-2974
- 30 15. Stinchi, S., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Coenen, R., Beccari, T., Orlaccio, A., von Figura, K., and Saftig, P. (1999) Targeted disruption of the lysosomal α -mannosidase gene results in mice resembling a mild form of human α -mannosidosis. *Hum. Mol. Gen.* 8, 1365-1372
- 35 16. Beccari, T., Apollini, M.G., Constanzi, E., Stinchi, S., Stirling, J.L., della Fazio, M.A., Servillo, G., Viola, M.P., and Orlacchio, A. (1997). Lysosomal alpha-mannosidases of

- mouse tissues: characteristics of the isoenzymes, and cloning and expression of a full-length cDNA. *Biochem J.* 327, 45-49
17. Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., and Hauser, H. (1988). Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68, 213-219
18. Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R., and von Figura, K. (1999). I-cell disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors. *Transgenic Res.* 7, 473-483
19. Tollersrud, O.K., Berg, T., Healy, P., Evjen, G., Ramachandran, U. and Nilssen, O. (1997) Purification of bovine lysosomal α -mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause α -mannosidosis. *Eur. J. Biochem.* 246, 410-419
20. Pohlmann, R., Wendland, M., Boeker, C. and von Figura, K. (1995) The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 27311-27318
21. Wessel, D. and Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143
22. Kakkis, E.D., Muenzer, J., and Tiller, G.E. (2001) Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 182-188
23. Ghosh, P., Dahms, N.M. and Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature reviews* 4, 202-212
24. Pontow, S.E., Kery, V., and Stahl, P.D. (1992) Mannose receptor. *Int. Rev. Cytol.* 137B, 221-244
25. Ashwell, G. and Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531-554
26. Sands, M.S., Vogler, C.A., Ohlemiller, K.K., Roberts, M.S., Grubb, J.H., Levy, B. and Sly, W.S. (2001) Biodistribution, kinetics and efficacy of highly phosphorylated and non-phosphorylated β -glucuronidase in the murine model of mucopolysaccharidosis VII. *J. Biol. Chem.* 276, 41160-43165
27. Ioannu, Y.A., Zeidner, K.M., Gordon, R.E. and Desnick, R.J. (2001) Fabry disease: preclinical studies demonstrated the effectiveness of α -galactosidase replacement in enzyme-deficient mice. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 14-25
28. Vogler, C., Levy, B., Galvin, N.J., Thorpe, C., Sands, M.S., Barker, J.E., Barty, J., Birkenmeier, E.H., and Sly, W.S. (1999) Enzyme replacement therapy in murine

- mucopolysaccharidosis type VII: neuronal and glial response to β -glucuronidase requires early initiation of enzyme replacement therapy. *Pediatr. Res.* 45, 838-844
29. Yu, W.H., Zhao, K.W., Ryzantsev, S., Rozengurt, N., and Neufeld, E.F. (2000) Short term enzyme replacement in the murine model of Sanfilippo syndrome type B. *Mol. Genet. Metab.* 71, 753-780
- 5 30. Miranda, S.R., He, X., Simonara, C.M., Gatt, S., Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2000) Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into Niemann-Pick disease mice leads to visceral, but not neurological correction of the pathophysiology. *FASEB J.* 14, 1988-1995
- 10 31. Du, H., Schiavi, S., Levine, M., Mishra, J., Heur, N., and Grabowski, G.A. (2001) Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1639-1648
32. Aebischer P, Goddard M, Signore AP, Timpson RL. 1994. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 126:151-158
- 15 33. Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE. 1996. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2:696-699
- 20 34. Austin J, McAfee D, Armstrong D, O'Rourke M, Shearer L, Bachhawat B. 1964. Abnormal sulphatase activities in two human diseases (metachromatic leucodystrophy and gargoylism). *Biochem J* 93:15C-17C
35. Barth ML, Fensom A, Harris A. 1995. Identification of seven novel mutations associated with metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 6(2):170-176
- 25 36. Bayever E, Ladisch S, Philippart M, Brill N, Nuwer M, Sparkes RS, Feig SA. 1985. Bone-marrow transplantation for metachromatic leucodystrophy. *Lancet* 2(8453):471-473
37. Bradley RT, Manowitz P. 1988. Electrochemical determination of lysosomal α -mannosidase activity using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 173(1):33-38
- 30 38. Bräulke T, Hille A, Huttner WB, Hasilik A, von Figura K. 1987. Sulfated oligosaccharides in human lysosomal enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* 143(1):178-185

39. Braulke T, Tippmer S, Chao HJ, von Figura K. 1990. Insulin-like growth factors I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 265(12):6650-6655
40. Deglon N, Heyd B, Tan SA, Joseph JM, Zurn AD, Aebischer P. 1996. Central nervous system delivery of recombinant ciliary neurotrophic factor by polymer encapsulated differentiated C2C12 myoblasts. *Hum Gene Ther* 7(17):2135-2146
41. Dierks T, Schmidt B, von Figura K. 1997. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(22):11963-11968
42. Draghia R, Letourneur F, Drugan C, Manicom J, Blanchot C, Kahn A, Poenaru L, Caillaud C. 1997. Metachromatic leukodystrophy: identification of the first deletion in exon 1 and of nine novel point mutations in the lysosomal alpha-mannosidase gene. *Hum Mutat* 9(3):234-242
43. Draper RK, Fiskum GM, Edmond J. 1976. Purification, molecular weight, amino acid, and subunit composition of lysosomal alpha-mannosidase from human liver. *Arch Biochem Biophys* 177(2): 525-538
44. Dubois G, Turpin JC, Baumann N. 1975. Arylsulfatases isoenzymes in metachromatic leucodystrophy/detection of a new variant by electrophoresis improvement of quantitative assay. *Biomedicine* 23(3):116-119
45. Eto Y, Tokoro T, Liebaers I, Vamos E. 1982. Biochemical characterization of neonatal multiple sulfatase deficient (MSD) disorder cultured skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 106(2):429-34
46. Farooqui AA. 1976. Purification and properties of human placenta arylsulphatase A. *Arch Int Physiol Biochim* 84(3):479-492
47. Farrell DF, MacMartin MP, Clark AF. 1979. Multiple molecular forms of lysosomal alpha-mannosidase in different forms of metachromatic leukodystrophy (alpha-mannosidosis). *Neurology* 29(1):16-20
48. Fujii T, Kobayashi T, Honke K, Gasa S, Ishikawa M, Shimizu T, Makita A. 1992. Proteolytic processing of human lysosomal alpha-mannosidase. *Biochim Biophys Acta* 1122(1):93-98
49. Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, Kappler J, Fluharty A, von Figura K. 1991. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Dev Neurosci* 13:222-227
50. Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP. 1994. Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 4:233-42

51. Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lullmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, DeDeyn P, Nagels G. 1998. Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J Inher Metab Dis* 21:564-574
52. Gniot-Szulzycka J. 1974. Some properties of highly purified arylsulphatase A from
5 human placenta. *Acta Biochim Pol* 21(3):247-254
53. Gustavson KH, Hagberg B. 1971. The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden. *Acta Paediatr Scand* 60(5):585-590
54. Hess B, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lullmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. 1996.
10 Phenotype of lysosomal alpha-mannosidase-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25):14821-14826
55. Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239(4837):290-2
56. Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. 1991. T-lymphocyte entry into the central nervous
15 system. *J Neurosci Res* 28(2):254-60
57. Inoue H, Seyama Y, Yamashita S. 1986. Specific determination of lysosomal alpha-mannosidase activity. *Experientia* 15;42(1):33-35
58. James GT. 1979. Essential arginine residues in human liver lysosomal alpha-mannosidase. *Arch Biochem Biophys* 197(1):57-62
- 20 59. James GT, Thach AB, Klassen L, Austin JH Studies in metachromatic leukodystrophy: XV. 1985. Purification of normal and mutant lysosomal alpha-mannosidase from human liver. *Life Sci* 37(25):2365-2371
60. Joss V, Rogers TR, Hugh-Jones K, Beilby B, Joshi R, Williamson S, Foroozanfar N, Riches P, Turner M, Benson PD, Hobbs JR. 1982 *Exp Hematol* 10, 52
- 25 61. Kelly BM, Yu CZ, Chang PL. 1989. Presence of a lysosomal enzyme, arylsulfatase-A, in the prelysosome-endosome compartments of human cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 48(1):71-78
62. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390(6661):687-690
30
63. Kreysing J, Polten A, Hess B, von Figura K, Menz K, Steiner F, Gieselmann V. 1994. Structure of the mouse lysosomal alpha-mannosidase gene and cDNA. *Genomics* 19(2):249-256
64. Kreysing J, von Figura K, Gieselmann V. 1990. Structure of the lysosomal alpha-mannosidase gene. *Eur J Biochem* 1990. *Eur J Biochem*. 191(3): 627-631
35

65. Krivit W, Shapiro E, Kennedy W, Lipton M, Lockman L, Smith S, Summers CG, Wenger DA, Tsai MY, Ramsay NK, et al. 1990. Treatment of late infantile metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 322:28-32
- 5 66. Krivit W, Shapiro E, Hoogerbrugge PM, Moser HW. 1992. State of the art review. Bone marrow transplantation treatment for storage diseases. *Keystone*. January 23, 1992. *Bone Marrow Transplant* 10 Suppl 1:87-96
67. Laidler PM, Waheed A, Van Etten RL. 1985. Structural and immunochemical characterization of human urine lysosomal alpha-mannosidase purified by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 827(1):73-83
- 10 68. Lee GD, van Etten RL. 1975. Evidence of an essential histidine residue in rabbit liver aryl sulfatase A. *Arch Biochem Biophys* 171(2):424-434
69. Luijten JAFM, Van Der Heijden MCM, Rijksen G, Staal GEJ. 1978. Purification and characterization of lysosomal alpha-mannosidase from human urine. *J Mol Med*. 1978, 3, 213
- 15 70. Manowitz P, Fine LV, Nora R, Chokroverty S, Nathan PE, Fazzaro JM. 1988. A new electrophoretic variant of lysosomal alpha-mannosidase. *Biochem Med Metab Biol* 39(1):117-120
71. Mould DL, Dawson AM, Rennie JC. 1970. Very early replication of scrapie in lymphocytic tissue. *Nature* 228(273):779-780
- 20 72. Ohashi T, Watabe K, Sato Y, Saito I, Barranger JA, Matalon R, Eto Y. 1996. Gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *Acta Paediatr Jpn* 38(2):193-201
73. Oya Y, Nakayasu H, Fujita N, Suzuki K, Suzuki K. 1998. Pathological study of mice with total deficiency of sphingolipid activator proteins (SAP knockout mice). *Acta Neuropathol (Berl)* 96(1):29-40
- 25 74. Poretz RD, Yang RS, Canas B, Lackland H, Stein S, Manowitz P. 1992. The structural basis for the electrophoretic isoforms of normal and variant human platelet arylsulphatase A. *Biochem J* 287 (Pt 3):979-983
75. Porter MT, Fluharty AL, Kihara H. 1971. Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. *Science* 1971,172, 1263-1265
- 30 76. Sangalli A, Taveggia C, Salviati A, Wrabetz L, Bordinon C, Severini GM. 1998. Transduced fibroblasts and metachromatic leukodystrophy lymphocytes transfer lysosomal alpha-mannosidase to myelinating glia and deficient cells in vitro. *Hum Gene Ther* 9(14):2111-2119
- 35

77. Sarafian TA, Tsay KK, Jackson WE, Fluharty AL, Kihara H. 1985. Studies on the charge isomers of lysosomal alpha-mannosidase. *Biochem Med* 33(3):372-380
78. Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. 1995. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 5 82(2):271-278
79. Selmer T, Hallmann A, Schmidt B, Sumper M, von Figura K. 1996. The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from *Volvox carteri*. *Eur J Biochem* 238:341-345
80. Shapira E, Nadler HL. 1975. Purification and some properties of soluble human 10 liver arylsulfatases. *Arch Biochem Biophys* 170(1):179-187
81. Shapiro EG, Lockman LA, Balthazor M, Krivit W. 1995. Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation. *J Inherit Metab Dis* 18:413-429
82. Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer 15 HE, O'Brien JS, von Figura K. 1989. Cloning and expression of human lysosomal alpha-mannosidase. *J Biol Chem* 264:1252-1259
83. Stevens RL, Fluharty AL, Skokut MH, Kihara H. 1975. Purification and properties of arylsulfatase. A from human urine. *J Biol Chem* 250(7):2495-2501
84. Stevens RL, Fluharty AL, Killgrove AR, Kihara H. 1976. Microheterogeneity of 20 lysosomal alpha-mannosidase from human tissues. *Biochim Biophys Acta* 445(3):661-671
85. von Figura K, Steckel F, Conary J, Hasilik A, Shaw E. 1986. Heterogeneity in late-onset metachromatic leukodystrophy. Effect of inhibitors of cysteine proteinases. *Am J Hum Genet*, 39, 371-382
86. Waheed A, Hasilik A, von Figura K. 1982. Synthesis and processing of lysosomal 25 alpha-mannosidase in human skin fibroblasts. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363(4):425-430
87. Waheed A, van Etten RL. 1985. Phosphorylation and sulfation of lysosomal alpha-mannosidase accompanies biosynthesis of the enzyme in normal and carcinoma cell 30 lines. *Biochim Biophys Acta* 847(1): 53-61
88. WO 02/99092 A (Fogh Jens; Hemebiotech AS (DK); Andersson Claes (SE); Weigelt Cecilia) 12 December 2002
89. Berg Thomas et al.: "Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase", *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 73, no. 1, 35 April 2001, pages 18-29

DİZİ LİSTESİ

- <110> Jens Fogh
- 5 Claes Anderson
Cecilia Weigelt
Diego Prieto Roces
Kurt von Figura
Meher Irani
- 10 <120> CNS'de anormal lizozomal depolamanın düzeltilmesi için alfa-mannosidaz kullanımı
<130> 36564PC01
<150> PA200400528
<151> 2004-04-01
- 15 <150> US 60/558,108
<151> 2004-04-01
<160> 2
<170> Windows Versiyonu 4.0 için FastSEQ
<210> 1
- 20 <211> 1011
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 1
- Met Gly Ala Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Val Cys Ala Asp Gly Cys Leu
- - - - -
Lys Ser Ala Gly Phe Trp Thr Met Ser Arg Ala Leu Arg Phe Phe Leu
- - - - -
Phe Thr Leu Cys Phe Phe Ser Ser Leu Leu Ala Ala Asp Gly Ala Arg
- - - - -
Ala Gly Gly Tyr Cys Cys Phe Cys Thr Thr Val Val Phe Ser Ser Leu Asp
- - - - -
Val Ser Leu Ser Phe Ser Thr Ser Arg Asp Asp Val Gly Trp Leu Ser Thr
- - - - -
Val Asp Ser Tyr Phe Tyr Gly Ile Cys Asp Asp Ile Ser His Ala Gly
- - - - -

450	455	460
Leu Ala Ala Gly Arg Gly Arg Tyr Ser Val	Leu Ileu Ser Ser Ala Leu	
465	470	475
Ala Ser Ser Arg Gly Ileu Leu Ser Leu Phe	Thr Phe Arg Gly Ala Ala Ser	
480	485	490
Arg Thr Ser Ileu Ser Ser Ser Ser Ser Thr	Ala Ala Arg Phe Ala Val	
495	500	505
Leu Val Tyr Arg Ser Leu Gly Arg Leu Val	Asn Trp Met Val Arg Leu	
510	515	520
Arg Val Ser Ile Gly Val Phe Val Val Leu	Arg Phe Ser Gly Arg Thr	
525	530	535
Val Pro Ser Arg Val Val Thr Phe Leu Leu	Glu Asp Ser Glu Ala His	
540	545	550
Pro Ser Gly Ileu Leu Thr Ser Ala Ser Leu	Arg Ala Leu Glu Phe Thr	
555	560	565
Thr Tyr Ser Val Ala Glu Val Thr Arg Trp	Lys Pro Glu Ala Arg His	
570	575	580
Pro Glu Ser Ser Ser Arg Arg Ser Trp Ser	Val Phe Leu Thr Ile Glu	
585	590	595
Arg Glu Ala Ileu Arg Ala Thr Phe Asn Ser	Asp Thr Gly Leu Arg Val	
600	605	610
Ileu Thr Ser Ser Met Ser Glu Glu Leu Ser	Leu Thr Pro Val Arg Glu Thr	
615	620	625
Pro Ser Ser Tyr Ser Ala Ser Thr Gly Ser	Asn Ser Ser Ser Glu Glu	
630	635	640
Ser Gly Ala Tyr Ile Phe Arg Ser Arg Glu	Glu Lys Arg Leu Pro Val	
645	650	655
Glu Arg Trp Ala Glu Ileu Ser Leu Val Leu	Thr Pro Leu Val Glu Glu	
660	665	670
Val His Glu Asn Phe Ser Ser Lys Lys Ser	Glu Val Val Asn Leu Tyr	
675	680	685
Phe Gly Ser Arg His Leu Glu Leu Glu Trp	Ser Val Gly Pro Leu Pro	
690	695	700
Val Arg Asp Thr Ser Gly Lys Thr Val Thr	Ser Ser Thr Asp Thr Thr	
705	710	715
Leu Glu Thr Lys Gly Arg Phe Tyr Thr Trp	Arg Asn Gly Arg Glu Ile	
720	725	730
Leu Glu Arg Arg Arg Arg Tyr Tyr Ser Thr	Trp Lys Leu Asn Glu Thr	
735	740	745
Val Ser Val Ala Gly Asn Tyr Tyr Phe Val	Asn Thr Arg Ile Tyr Leu	
750	755	760
Thr Asp Gly Asn Met Glu Leu Thr Val Leu	Thr Arg Asn Ser Glu Val	
765	770	775
Arg Ser Ser Leu Arg Asp Gly Ser Leu Glu	Leu Met Val Glu Arg Arg	
780	785	790

[illegible] $\langle 210 \rangle_2$

<211> 8079

<212> DNA

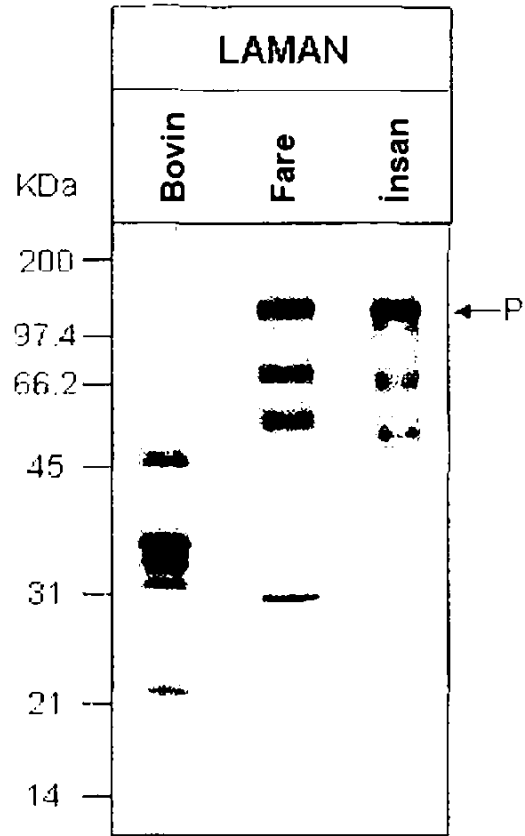
5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> ifade plazmidi pLamanExp1

<400> 2

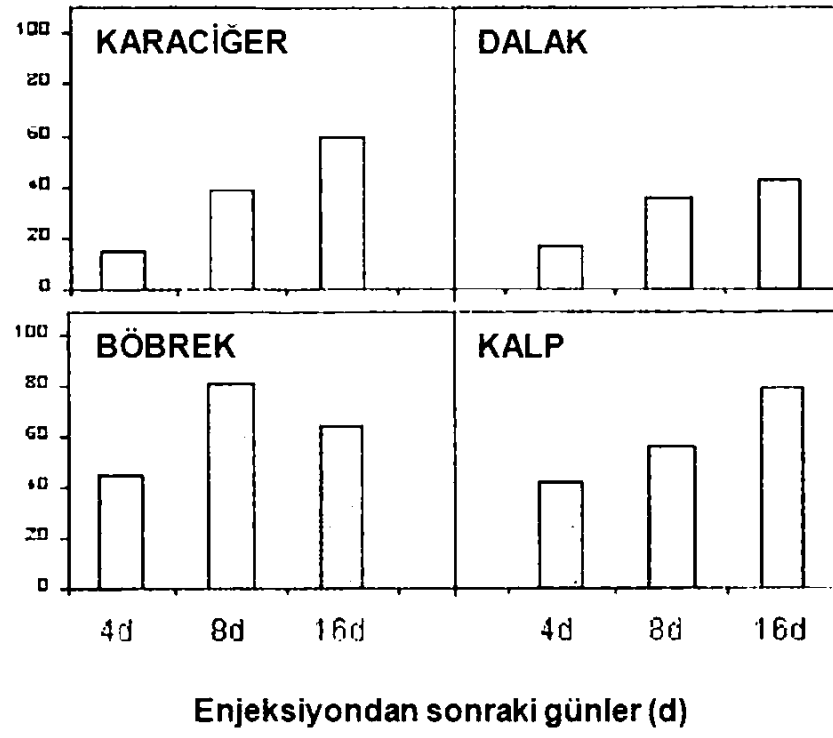
agatagaaa	agattggaat	agagaaatt	aaatagagt	aaataaata	aaataaata	81
aggtatagg	aaattgaaa	agtggaat	ataataaat	agtaaat	ataataaat	120
atgttaata	aaataga	atgtgaa	atgaaagt	agtaataat	agtaataat	180
aaaggggaa	aaagtaata	aaataaat	agaaataaa	gttaataat	aaagaaata	240
taagaaat	atgtgaagt	aaagaaat	aaagaaat	aaat	aaat	300
aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	360
aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	420
aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	aaagaaat	480

**ŞEKİL 1**

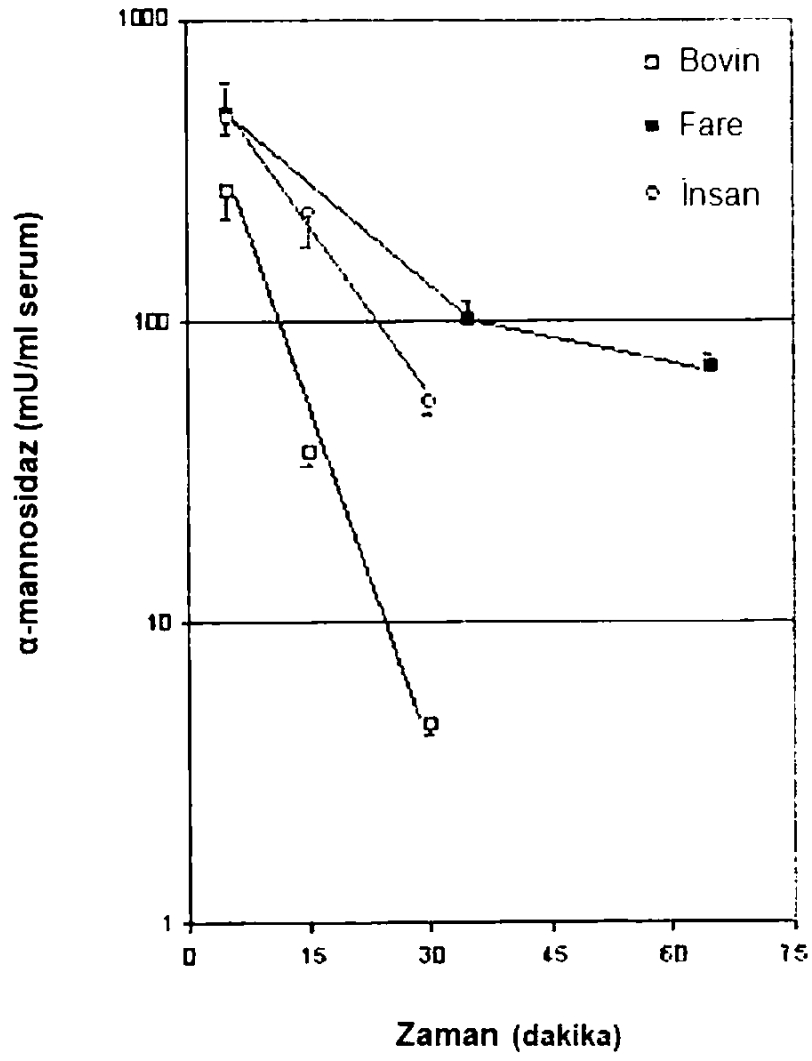
		KARACİĞER					DALAK				
M2	←										
M3	←										
M4	←										
M5	←										
M6	←										
M7	←										
M8	←										
M9	←										
		BÖBREK					KALP				
M2	←										
M3	←										
M4	←										
M5	←										
M6	←										
M7	←										
M8	←										
M9	←										
Sütun		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

ŞEKİL 2

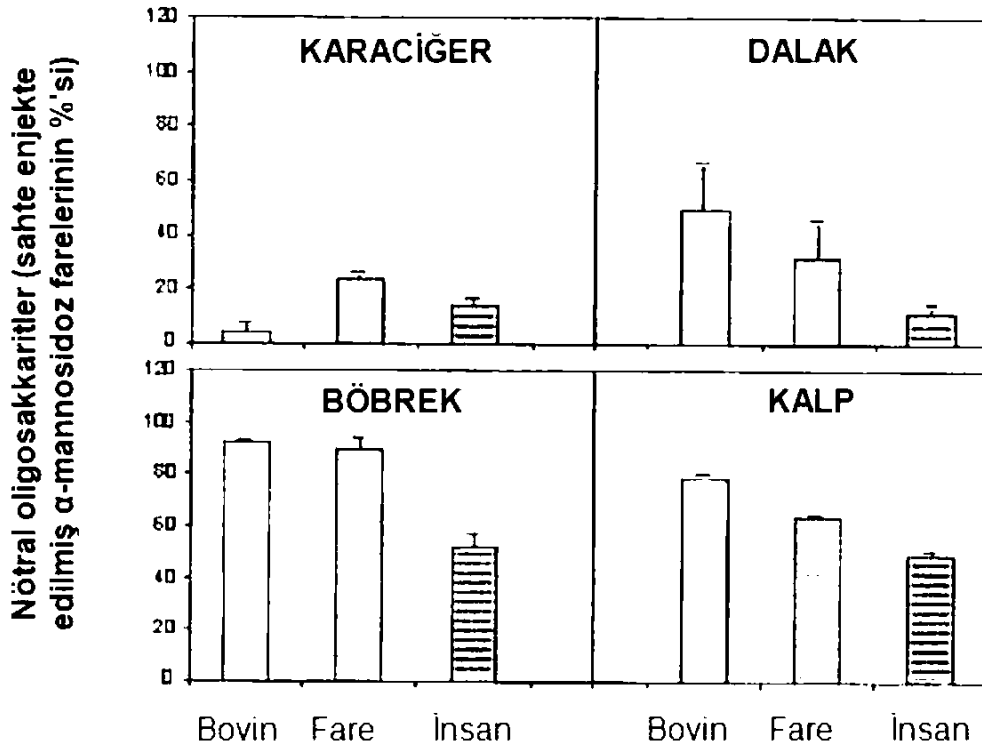
Nötral oligosakkaritler (sahte enjekte
edilmiş α -mannosidoz farelerinin %'si)



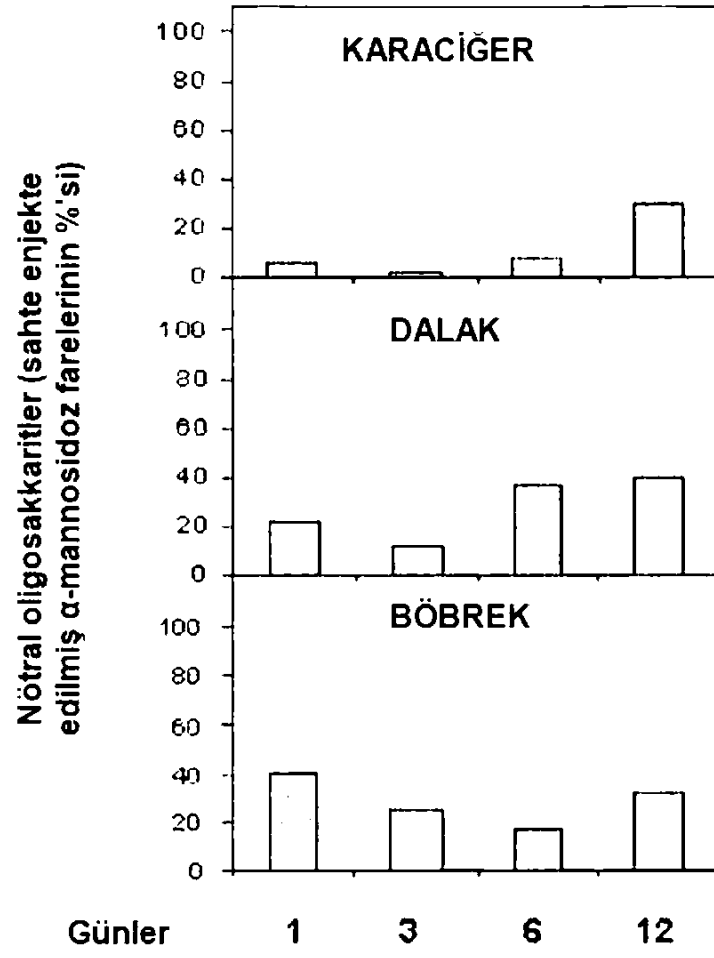
ŞEKİL 3



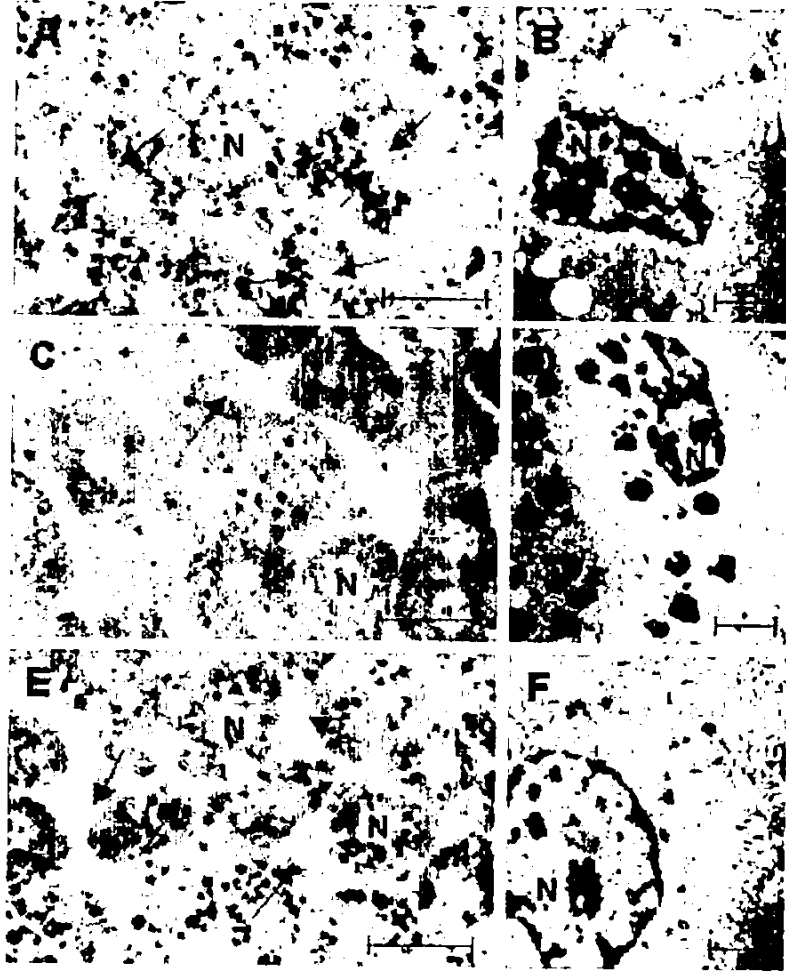
ŞEKİL 4



ŞEKİL 5



ŞEKİL 6



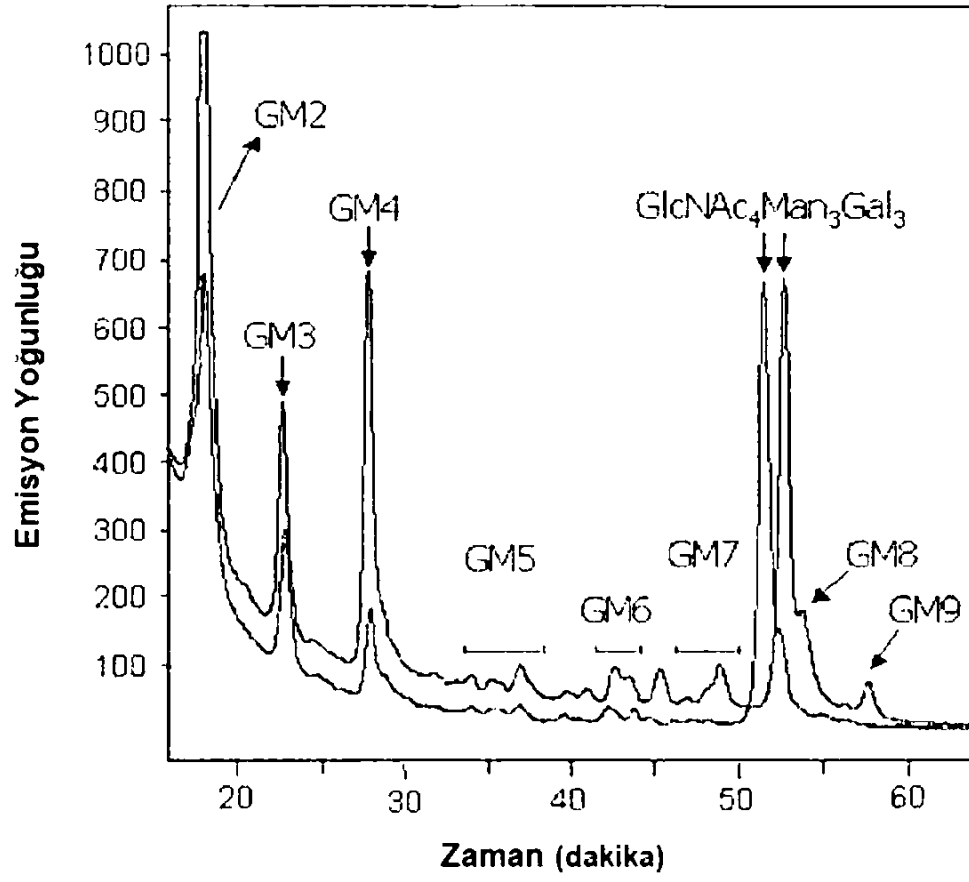
ŞEKİL 7

	DALAK			BÖBREK			KALP			BEYİN			
M2 —				—			—						→
M3 —							—			—			→
M4 —				—						—			
M5 —							—			—			
M6 —				—			—			—			
M7 —				—			—			—			
M8 —				—			—			—			
M9 —				—			—			—			
				—			—			—			
Sütun	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	

ŞEKİL 8



ŞEKİL 9



ŞEKİL 10