

PD 260687

73.366/SZE

12

Gyógyászati készítmények az alfa-galaktozidáz A deficiencia
kezelésére

KIVONAT

A jelen találmány tárgyát erősen tisztított alfa-galaktozidáz A, valamint ennek különböző tisztítási módszerei, valamint megváltoztatott töltésű készítmények és az ezeknek a készítményeknek az előállítására szolgáló eljárások; az olyan alfa-galaktozidáz A készítmények, amiknek megnőtt a felezési ideje egy emlős keringésében, és ezeknek az eljárásoknak az előállítási módszerei, és egy alfa-galaktozidáz A készítménynek egy alanyba való beadási módszerei képezik.



2002.02.28.

P0200/R7

S.B.G. & A.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-959, Fax: 34-24-323



73.366/SZE

Gyógyászati készítmények az alfa-galaktozidáz A deficiencia kezelésére

A jelen találmány tárgyát az alfa-galaktozidáz A deficiencia kezelésére szolgáló módszerek és készítmények képezik.

A Fabry-betegség az X-kromoszómához kötődő lizoszómális tárolási betegség, amit súlyos veseproblémák, angiokeratómák és kardiovaszkuláris abnormalitások jellemeznek, beleértve a ventrikuláris megnagyobbodást és a mitrális billentyű elégtelenséget. A Fabry betegség érinti a periferiális idegrendszert, ami a végtagokban kínzó, égető fájdalmat okoz. A Fabry-betegséget az alfa-galaktozidáz enzim A (α -Gal A) deficienciája okozza. Az alfa-galaktozidáz A lizoszómális glikohidroláz, ami a különböző glikokonjugátumok terminális alfa-galaktozil egységeit hasítja le. A Fabry betegség a neutrális glikoszfinbolipid, a ceramid-trihexozid (CTH) katabolizmusának gátlását, és ennek az enzim szubszt rátnak a sejtekben és a véráramban való akkumulálódását eredményezi.

Mivel a betegség az X-kromoszómához kapcsolódik, a legtöbb Fabry-betegségben szenvedő beteg férfi. Bár megfigyeltek súlyosan érintett női heterozigótákat is, a női heterozigóták gyakran tünetmentesek, vagy viszonylag enyhék a tünetei (ami lehet például a szaruhártya jellegzetes homályossága). A Fabry-betegség egy atipikus variánsa, beleértve az alacsony reziduális alfa-



galaktozidáz A aktivitást, és vagy a nagyon enyhe tüneteket, vagy azt, hogy látszólag nincsenek más, a Fabry-betegségre jellemző tünetek, korrelál a bal ventrikuláris hipertrófiával és szívbetegséggel [Nakano és mtsai: The New England Journal of Medicine 333, 288-293 (1995)]. Az alfa-galaktozidáz A csökkenése lehet az oka az ilyen szívrendellenességeknek.

A humán alfa-galaktozidáz A-t kódoló cDNS-t és gént izolálták és szekvenálták. A humán alfa-galaktozidáz A 429 aminosavból álló polipeptid formájában expresszálódik, aminek 31 N-terminális aminosava a szignálpeptid. A humán enzimet expresszáljuk aranyhőrcsög petefészek (CHO) sejtekben [Desnick és mtsai: 5,356,804 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás; Ioannou és mtsai: Journal of Cell Biology 119, 1137 (1992)] valamint rovarsejtekben [Calhoun és mtsai: WO 90/11353].

Azonban a jelenleg használt alfa-galaktozidáz A-nak korlátozott a hatékonysága. A viszonylag magas tisztaságú alfa-galaktozidáz A előállítása függ az affinitáskromatográfia használatától, amiben lektin affinitáskromatográfia (konkanavalin A (Con A) Sepharose) és az alfa-galaktozidáz A-nak egy Sepharose mátrixhoz kapcsolt N-6-aminohexanoil- α -D-galaktozilamin szubszt ráthoz való kötődésén alapuló affinitáskromatográfia kombinációját használjuk [Bishop és mtsai: Journal of Biological Chemistry 256, 1307-1316 (1981)]. A fehérjetartalmú lektin-affinitás gyanták és a szubsztrát analóg gyanták használata tipikus esetben együttjár az affinitás ágensnek a szilárd hordozóról való



folyamatos leválásával [Marikar és mtsai: Analytical Biochemistry 201, 306-310 (1992)], ami a tisztított terméknek vagy oldatban szabadon levő vagy az eluált fehérjéhez kötött affinitás-ágenssel való szennyeződését eredményezi. Az ilyen szennyezések a terméket alkalmatlanná teszik gyógyászati készítményekben való felhasználásra. A megkötött szubsztrát analógok és a lektinek szintén jelentős negatív hatással vannak a fehérjék enzimatis, funkcionális és strukturális tulajdonságaira. Emellett, a korábbi szakirodalom szerinti módszerekkel előállított alfa-galaktozidáz A-t a máj gyorsan kiüríti.

Tehát a szakterületen megmaradt az igény egy olyan tisztítási protokollra, amiben hagyományos kromatográfiás gyantákat használnak, amik könnyen beszerezhetők kereskedelmi mennyiségű anyag előállításához szükséges mennyiségben és minőségben, és olyan alfa-galaktozidáz A készítményt eredményeznek, amik mentesek az affinitás ágensektől. Emellett a szakterületen megmaradt az igény olyan alfa-galaktozidáz A készítményekre, amiknek megnőtt keringési felezési idejük, és megnőtt a felvételük a májtól eltérő specifikus szövetekben.

A jelen találmány tárgyát erősen tisztított alfa-galaktozidáz A készítmények, valamint az alfa-galaktozidáz A glikoformok tisztításának különböző módszerei képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá olyan alfa-galaktozidáz A készítmények, amiknek megváltozott a töltésük, valamint a találmány tárgyát képezik ezeknek a készítményeknek az előállítási módszerei. A töltés megváltoztatását úgy érjük el, hogy megnöveljük az alfa-



galaktozidáz A szíalsav tartalmát, és/vagy fokozzuk az alfa-galaktozidáz A foszforilezését. A találmány tárgyát képezik továbbá az olyan alfa-galaktozidáz A készítmények, amiknek megnőtt a keringési felezési idejük emlős gazdaszervezetben, valamint ezek előállítási módszerei. Végezetül, a jelen találmány tárgyát képezik az alfa-galaktozidáz A készítménynek egy alanyba való beadásához szükséges módszerek és dózisok. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények jól használhatók lesznek Fabry-betegségben szenvedő emberek kezelésére, vagy a Fabry-betegség atipusos formáiban, azaz például a Fabry betegek főleg kardiovaszkuláris abnormalitásban, mint például ventrikuláris nagyobbodásban, úgymint baloldali ventrikuláris hipertrófiában (LVH), és/vagy mitrális billentyű-elégtelenségben szenvedő specifikus populációiban, vagy azoknál a Fabry betegeknél, akiknek főleg a veséjével van probléma.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékelt ábrákat.

Az 1. ábrán egy alfa-galaktozidáz A cDNS-nek humán fibroblaszt cDNS könyvtárból való izolálására használt 210 bázispár méretű próba (1. számú szekvencia) látható. Ez a szekvencia az alfa-galaktozidáz A gén 7-es exonjából származik. A próbát humán genomiális DNS-ből izoláljuk polimeráz láncreakcióval (PCR). Az ábrán aláhúzott régiók megfelelnek az amplifikációs primerek szekvenciáinak.

A 2. ábrán annak a DNS fragmensnek a szekvenciája látható, ami kiegészíti az alfa-galaktozidáz A cDNS klón 5' végét (2. számú szekvencia). Ezt a fragmenst humán genomiális DNS-ből

izoláljuk polimeráz láncreakcióval. Az ábrán aláhúzott régiók megfelelnek az amplifikációs primerek szekvenciáinak. Az alábbi, 1. példában ismertetett szubklónozáshoz használt NcoI és SacII restriktációs endonukleáz hasítási helyek pozícióit is megmutatjuk.

A 3. ábra az alfa-galaktozidáz A cDNS szekvenciáját mutatjuk be, beleértve a szignálpeptidet kódoló szekvenciát is (3. számú szekvencia).

A 4. ábra a pXAG-16, egy alfa-galaktozidáz A expressziós konstrukció sematikus térképe, ami tartalmazza a CMV (citomegalovírus) promoterét, az 1-es exont és az 1. intront, a hGH szignálpeptidet kódoló szekvenciát és az első intront, az alfa-galaktozidáz A cDNS-ét (amiből hiányzik az alfa-galaktozidáz A szignálpeptid szekvencia), és a hGH 3' UTS-ét. A pcDNeo a pcDNeo génből származó neo gén pozícióját mutatja.

Az 5. ábra a pXAG-28, egy alfa-galaktozidáz A expressziós konstrukció sematikus térképe, ami tartalmazza a kollagén I α 2 promotert és az első exont, a alfa-galaktozidáz A cDNS-t (amiből hiányzik az alfa-galaktozidáz A szignálpeptid szekvencia), és a hGH 3' UTS-ét. A pcDNeo a pcDNeo génből származó neo gén pozícióját mutatja.

A 6. ábrán a humán alfa-galaktozidáz A aminosav szekvenciáját mutatjuk be (4. számú szekvencia).

A 7. ábrán a humán alfa-galaktozidáz A aminosav szekvenciáját mutatjuk be (szignálpeptid nélkül) (5. számú szekvencia).

A 8. ábra az alfa-galaktozidáz A tisztítási lépésének egy kromatogramja, amihez Butyl Sepharose gyantát használunk. A

kiválasztott frakciók 280 nm-en mért elnyelését (folyamatos vonal) és alfa-galaktozidáz A aktivitását (pont-vonal) mutatjuk be.

A 9. ábra a pGA213C sematikus térképe.

A 10. ábra a célzó konstrukció, a pGA213C és az endogén alfa-galaktozidáz A lókuszt homológ rekombinációjának diagrammatikus reprezentációja. A pGA213C-t úgy ábrázoljuk, mint a célzó szekvenciák egymáshoz illesztését az X-kromoszóma alfa-galaktozidáz A lókuszt megfelelő szekvenciái felett. A metionin iniciációs kodont, az ATG-t számokkal jelezzük a lineáris térképek felett. A rágcsáló dihidrofolát-reduktázt, bakteriális neomicin rezisztenciát és citomegalovírus promotor/aldoláz intron szekvenciákat tartalmazó aktiváló egységeket a fölött a pozíció fölött (-221) ábrázoljuk, amikbe a DNS klónozással beépítjük őket. Az alfa-galaktozidáz A kódoló szekvenciát szürkített négyszögekkel jelöljük. A nem-alfa-galaktozidáz A-t kódoló genomiális szekvenciákat halványan szürkített négyszögekkel jelezzük. A nagy nyilak a dihidrofolát-reduktáz és neomicin-rezisztencia expressziós kazetták transzkripciójának irányát mutatják. GA-GAL mRNS illesztését a sikeres célzás és génaktiválás után szaggatott vonallal jelezzük az aktivált alfa-galaktozidáz A (GA-GAL) lókuszt térképe alatt.

A jelen találmány tárgyát új alfa-galaktozidáz A készítmények, valamint ezek előállításai eljárásai képezik, valamint a Fabry-betegségben vagy az atípusos Fabry-betegségben szenvedő betegek kezelési eljárásai képezik, amikben ezeket a készítményeket használják. Néhány reprezentatív megvalósítási módot az

alábbiakban részletesebben összefoglalunk, ismertetünk az alábbiakban.

A jelen találmányban bármilyen sejtben (egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtben) előállított alfa-galaktozidáz A-t használunk a Fabry-betegség kezelésére. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány standard génszabványi technikákkal (amik azon alapulnak, hogy a klónozott alfa-galaktozidáz A gént vagy cDNS-t bejuttatjuk egy gazdasejtbe), vagy génaktiválással előállított humán alfa-galaktozidáz A-t használunk.

A jelen találmány tárgyát olyan készítmények, valamint ezek előállítási eljárásai képezik, amik a korábban ismertnél tisztább alfa-galaktozidáz A készítményt tartalmaznak. A jelen találmány szerinti tisztítási módszerek alkalmazásával a humán alfa-galaktozidáz A készítmények összetételeit előnyösen legalább 98%-os homogenitásig tisztítjuk, még előnyösebben 99%-os homogenitásig, és legelőnyösebben legalább 99,5%-os homogenitásig, SDS-PAGE vagy fordított fázisú HPLC mérések alapján. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények specifikus aktivitása előnyösen legalább $2,0 \times 10^6$ egység/fehérje, még előnyösebben legalább $3,0 \times 10^6$ egység/fehérje, és legelőnyösebben legalább $3,5 \times 10^6$ egység/fehérje.

Az egyik megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítjuk elő, hogy az alfa-galaktozidáz A különböző glikoformáit egy hidrofób kölcsönhatást használó gyantán elválasztjuk a többi komponenstől, de nem tartozik ide a lektin

kromatográfiás lépés. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a hidrofób kölcsönhatáson alapuló gyanta funkcionális egysége tartalmaz egy butilcsoportot.

Egy alternatív megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A készítményt úgy tisztítjuk meg, hogy először az alfa-galaktozidáz A különböző glikoformáit egy oszlopba töltött kationcserélő gyantához kötjük, savas pH-jú ekvibráló pufferben. Az oszlopot az ekvibráló pufferrel mossuk, hogy eluáljuk a megkötetlen anyagot, majd az alfa-galaktozidáz A különböző glikoformáit eluáljuk, ehhez egy eluáló oldatot, ami lehet 10-100 mmol/l koncentrációjú sóoldat, pH=4-5 savasságú pufferoldat, vagy ezek kombinációja lehet. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az ekvibráló puffer pH-ja körülbelül 4,4.

Egy másik alternatív megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A készítményt úgy tisztítjuk meg, hogy egy mintában az alfa-galaktozidáz A különböző glikoformáit elválasztjuk a minta többi komponensétől, olyan tisztítási eljárást használva, ami legalább egy kromatofókuszáló kromatográfiát, fémkelát affinitási kromatográfiát, vagy immunaflatitási kromatográfiát tartalmaz tisztítási eljárasként.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan alfa-galaktozidáz A készítmények, és ezeknek az alfa-galaktozidáz A készítményeknek az előállítási eljárásai, amiknek megváltozott a töltése. A készítmények tartalmazhatják az alfa-galaktozidáz A különböző glikoformáit is. A töltés megváltoztatását úgy érhetjük el, hogy megnöveljük az alfa-galaktozidáz A készítmények

sziálsav-tartalmát, és/vagy megnöveljük az alfa-galaktozidáz A készítmények foszforilezettségét.

Az alfa-galaktozidáz A készítmények sziálsav-tartalmát a következőképpen növelhetjük: i) a tisztítási eljárás során vagy után izoláljuk az erősen töltött és/vagy magas molekulásúlyú alfa-galaktozidáz A glikoformákat; ii) a szialil-transzferáz gén vagy cDNS expresszálása céljából genetikailag módosított sejtek (amiket vagy hagyományos génsebészeti eljárással, vagy génaktiválással módosítottunk) használatával sziálsav csoportokat adunk a molekulához; vagy iii) az enzimet expresszáló sejteket fermentáljuk vagy szaporítjuk, alacsony ammónium-szintű környezetben.

Az alfa-galaktozidáz A készítmények foszforilezettségét úgy növeljük, hogy i) a foszforil-transzferáz gén vagy cDNS expresszálása céljából genetikailag módosított sejtek (amiket vagy hagyományos génsebészeti eljárással, vagy génaktiválással módosítottunk) használatával foszfátcsoportokat adunk a molekulához; vagy ii) a tenyésztett sejtekhez foszfátáz-inhibitorokat adunk.

A jelen találmány szerinti módszerek alkalmazásával glikozilezett humán alfa-galaktozidáz A készítményeket kapunk, amikben az oligoszacharidok 35-85%-a töltött. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az oligoszacharidoknak legalább 35%-a töltött. Egy még inkább előnyben részesített megvalósítási mód szerint az oligoszacharidoknak legalább 50%-a töltött.

Az alternatív, előnyben részesített humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmények több alfa-galaktozidáz A glikoformából állnak, amiknek előnyösen legalább 20%-a, előnyösebben legalább 50%-a, és legelőnyösebben legalább 70%-a 2-4 szíálsav csoportot tartalmazó komplex glikán. Egy alternatív, előnyben részesített megvalósítási mód szerint a több glikoformából álló humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmények oligoszacharid töltéssel rendelkeznek, amit egy 100-nál nagyobb Z számmal mérünk, ami előnyösen 150-nél nagyobb, még előnyösebben 170-nél is nagyobb. Egy másik, előnyben részesített megvalósítási mód szerint a több glikoformából álló humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmények legalább 16-50%, előnyösen 25-50%, még előnyösebben legalább 30% foszforilezett glikoformát tartalmaznak. Egy alternatív megvalósítási mód szerint a több glikoformát tartalmazó készítményekben az össz-glikánnak 50-75%-a, előnyösen 60%-a szializálva van.

A jelen találmány egyik megvalósítási módja szerint a megnövelt oligoszacharid töltésű glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítjuk elő, hogy először bejuttatunk egy GlcNac transzferáz III-at (GnT-III) kódoló polinukleotidot egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe, vagy homológ rekombinációval egy szabályozó-szekvenciát juttatunk be, ami szabályozza egy endogén GnT-III gén expresszióját. Az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet azután olyan körülmények között tenyésztjük, ami az alfa-galaktozidáz A és a GnT-III expresszióját eredményezi. A végső lépés



azután abból áll, hogy az alfa-galaktozidáz A készítmény megnövekedett oligoszacharid töltést tartalmaz.

A jelen találmány egy alternatív megvalósítási módja szerint megnövekedett oligoszacharid töltéssel rendelkező glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítunk elő, hogy először egy szialil-transzferázt kódoló polinukleotidot juttatunk be egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe, vagy homológ rekombinációval egy szabályozó-szekvenciát juttatunk be, ami szabályozza egy endogén szialil-transzferáz gén expresszióját. Az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet azután olyan körülmények között tenyésztjük, ami az alfa-galaktozidáz A és a szialil-transzferáz expresszióját eredményezi. A végső lépés az, hogy izoláljuk a megnövekedett oligoszacharid töltéssel rendelkező alfa-galaktozidáz A készítményt. Az előnyben részesített szialil-transzferáz tartalmaz egy α 2,3-szialil-transzferázt és egy α 2,6-szialil-transzferázt. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint ez a lépés tartalmaz még egy további lépést, amiben a készítmény frakcionálásával vagy tisztításával megnőtt méretű vagy a töltésű alfa-galaktozidáz A glikoformákat szelektálunk.

Egy másik megvalósítási mód szerint egy erősebben szializálódott glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítunk elő, hogy egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet érintkezésbe hozunk egy 10 mmol/l-nél, vagy előnyösebben 2 mmol/l-nél kisebb koncentrációjú ammóniumot tartalmazó tenyésztő táptalajjal. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alacsony ammónium-koncentrációjú környezetet úgy



érjük el, hogy glutamin-szintetázt adunk a tenyésztő táptalajhoz. Egy alternatív, előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alacsony ammónium-koncentrációt úgy érjük el, hogy az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet folyamatosan vagy megszakításokkal perfundáltatjuk friss tenyésztő táptalaj, hogy az ammónium-koncentrációt 10 mmol/l, előnyösebben 2 mmol/l alatt tartsuk.

Egy további megvalósítási mód szerint egy erősebben foszforilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítunk elő, hogy először egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe egy foszforil-transzferázt kódoló polinukleotidot juttatunk be, vagy vagy homológ rekombinációval egy szabályozó-szekvenciát juttatunk be, ami szabályozza egy endogén foszforil-transzferáz gén expresszióját. Az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet azután olyan körülmények között tenyésztjük, amik az alfa-galaktozidáz A és a foszforil-transzferáz expresszióját eredményezik. Ezután izoláljuk a polinukleotid nélküli sejtben előállított alfa-galaktozidáz A-hoz viszonyítva erősebben foszforilezett alfa-galaktozidáz A készítményt. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a jelen találmány szerinti eljárásokkal előállított alfa-galaktozidáz A készítmények több glikoformát tartalmaznak, és a glikoformák 16-50%-a, előnyösen 25-50%-a, még előnyösebben legalább 30%-a foszforilezve van. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint ez a módszer magában foglal egy további lépést, amivel a készítmény frakcionálásával vagy tisztításával ki lehet választani a megnövelt méretű vagy megnövelt töltésű alfa-galaktozidáz A glikoformákat.



Egy további megvalósítási mód szerint egy erősebben foszforilezett, glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy kapunk meg, hogy egy foszfatáz-inhibítort, azaz például brómtetramizolt adunk a tenyésztett sejtekhez. A szarvasmarha plazma alkalikus foszfatáz alacsony szintje lehet jelen egy borjúmagzat szérumban, amit a tenyésztett sejtek szaporításához adalékanyagként használhatunk. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a szekretált alfa-galaktozidáz A-n levő exponált Man-6-P lehet a szérum alkalikus foszfatáz szubsztrátja.

A brómtetramizolról kimutatták, hogy az alkalikus foszfatáz hatásos inhibitora; $K_i=2,8$ mmol/l [Metaye és mtsai: *Biochem. Pharmacol.* 15, 4263-4268 (1988)], És a teljes gátlást 0,1 mmol/l koncentrációnál lehet elérni [Borgers & Thone: *Histochemistry* 44, 277-280 (1975)]. Ennek következtében az egyik megvalósítási mód szerint egy foszfatáz-inhibitor, azaz például brómtetramizol adható a tenyésztett sejtekhez, hogy maximalizáljuk a tenyésztő közegben levő high-uptake alfa-galaktozidáz A formát, megakadályozva a Man-6-P észtercsoportok hidrolízisét.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az alfa-galaktozidáz A készítmények, ezek előállítási módjai, amiknek emlős gazdaszervezetben megnőtt a keringési felezési ideje. A keringésben való felezési idő, és a sejtbe való bejutás fokozható, ha i) növeljük az alfa-galaktozidáz A sziálsav-tartalmát (amit az előzőekben ismertetett módon lehet elérni); ii) növeljük az alfa-galaktozidáz A foszforilezettségét (amit az előzőekben ismertetett módon lehet elérni); iii) az alfa-galaktozidáz A pegilezése; vagy iv) a sziálsav és



a terminális galaktóz-csoport szekvenciális eltávolítása, vagy a terminális galaktóz csoportok eltávolítása az alfa-galaktozidáz A oligoszacharid láncairól.

Az alfa-galaktozidáz A készítmények javított szializálása fokozza az exogén alfa-galaktozidáz A keringési felezési idejét. Emellett, az alfa-galaktozidáz A javított szializálása a hepatocitákkal összehasonlítva javítja a sejtekbe való bejutást a nem-hepatocitákba, azaz például a máj endoteliális sejtekbe vagy a szívizom-sejtekbe. A megnövelt szíalsav tartalmú humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény előnyösen több glikoformot tartalmaz, amiknek legalább 20%-a komplex, 2-4 szíalsav-csoportot tartalmazó glikán. Egy alternatív előnyben részesített humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény több glikoformból áll, amiben az össz-glikánok 50-75%-a, előnyösen legalább 60%-a szialilezett.

Az alfa-galaktozidáz A készítmények foszforilezése is javítja az alfa-galaktozidáz A sejtekbe való bejutási képességét. A foszforilezés az alfa-galaktozidáz A-t expresszáló sejtekben fordul elő. Az egyik jelen találmány szerinti humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A előnyösen több glikoformát tartalmaz, amely glikoformok átlagosan 16-50%-ban, előnyösen 25-50%-ban, még előnyösebben legalább 30%-ban foszforilezve vannak.

Egy alternatív megvalósítási mód szerint a humán alfa-galaktozidáz A készítmény keringési felezési idejét úgy lehet fokozni, hogy az alfa-galaktozidáz A-t polietilén-glikollal komplexbe vesszük. Egy előnyben részesített megvalósítási mód



szerint az alfa-galaktozidáz A készítményt trezil-monometoxi PEG-gel (TMPEG) lehet komplexbe vinni, pegilezett alfa-galaktozidáz A képződése közben. A pegilezett alfa-galaktozidáz A-t azután tisztítjuk, izolált, pegilezett alfa-galaktozidáz A készítmény előállításával. Az alfa-galaktozidáz A pegilezése fokozza a keringési felezési időt, és a fehérje *in vivo* hatékonyságát.

A szialilezés befolyásolja a fehérjék keringési felezési idejét és biológiai eloszlását. A szíálsavat nem, vagy csak minimális mértékben tartalmazó fehérjéket könnyen internalizálja az asziialoglikoprotein receptor (Ashwell receptor) a hepatocitákon, a fehérje exponált galaktóz csoportjai révén. A galaktózzal záródó alfa-galaktozidáz A keringési felezési ideje növelhető, ha egymás után 1) eltávolítjuk a szíálsavat, oly módon, hogy az alfa-galaktozidáz A-t neuraminidázzal (szialidáz) hozzuk érintkezésbe, ezzel a terminális galaktóz egységeket exponálva hagyva, és 2) a terminális galaktozid csoportokat eltávolítjuk, a deszialiszt alfa-galaktozidáz A-t β -galaktozidázzal hozva érintkezésbe. A kapott alfa-galaktozidáz A készítményben kevesebb terminális szíálsav és/vagy terminális galaktozidáz csoport van az oligoszacharid láncokon, azokkal az alfa-galaktozidáz A készítményekkel összehasonlítva, amiket nem hoztunk érintkezésbe szekvenciálisan neuraminidázzal és β -galaktozidázzal. Egy másik változat szerint a galaktózzal lezárt alfa-galaktozidáz A keringési felezési ideje javítható úgy is, ha csak a terminális galaktozid egységeket távolítjuk el a deszialiszt alfa-galaktozidáz A-t β -galaktozidázzal érintkezésbe hozva. A kapott alfa-galaktozidáz A készítményben



kevesebb terminális galaktozid csoport van az oligoszacharid láncokon, azokkal az alfa-galaktozidáz A készítményekkel összehasonlítva, amiket nem hoztunk érintkezésbe β -galaktozidázzal. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a neuraminidázzal és β -galaktozidázzal egymás után való érintkezés után a kapott alfa-galaktozidáz A készítményeket β -hexózaminidázzal hozzuk érintkezésbe, ezzel lehasítva az oligoszacharidot a trimannóz magról.

Emellett a szialilezési szint a használt sejttípustól függően változhat. Ennek következtében egy másik előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A szialilezését fokozni lehet, ha olyan emlős sejteket, azaz például humán sejteket keresünk, amiknek viszonylag magas a szialil-transzferáz aktivitása, és ezeket a sejteket használjuk alfa-galaktozidáz A termelő sejtekként.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá egy alfa-galaktozidáz A készítmény olyan kiszerelési formái, amik lényegében mentesek minden nem-alfa-galaktozidáz A fehérjétől, azaz például az albumintól, a gazdasejt által termelt nem-alfa-galaktozidáz A fehérjétől, vagy az állati szövetből vagy folyadékból izolált fehérjétől. Az egyik megvalósítási mód szerint a kiszerelési forma emellett tartalmaz töltőanyagot is. Az előnyben részesített töltőanyagok közé tartozik a mannit, a szorbit, a glicerin, az aminosavak, a lipidek, az EGTA, a nátrium-klorid, a polietilén-glikol, a polivinil-pirrolidon, a dextrán vagy bármelyik említett töltőanyag kombinációja. Egy másik megvalósítási mód szerint a kiszerelési



forma tartalmaz még nem-ionos detergenszeket is. Az előnyben részesített nem-ionos detergenszek közé tartozik a Polysorbate 20, a Polysorbate 80, a Triton X-100, a Triton X-114, a Nonidet P-40, az oktil-a-glükózid, az oktil-b-glükózid, a Brij-35, a Pluronic, és a Tween 20. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a nem-ionos detergens a Polysorbate 20 vagy a Polysorbate 80. Egy előnyben részesített készítményi forma tartalmaz még foszfáttal puffertelt sóoldatot, aminek a pH-ja előnyösen 6.

A jelen találmány tárgyát alfa-galaktozidáz A készítménynek egy alanyba való beadását szolgáló módszerek képezik. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A készítmény egy megváltozott töltésű alfa-galaktozidáz A készítmény, azaz például megnőtt az oligoszacharid töltése, és/vagy megnőtt a keringési felezési ideje, az itt ismertetett módon. A beadott dózis endogén 0,05-5,0 mg, még előnyösebben 0,1-0,3 mg alfa-galaktozidáz A készítmény per testsúlykg, hetente vagy kéthetente. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a beadott dózis körülbelül 0,2 mg per testsúlykg kéthetente. Ezekben a módszerekben a dózist beadhatjuk intramuszkulárisan, orálisan, rektálisan, szubkután, intraarteriálisan, intraperitoneálisan, intracerebrálisan, intranazálisan, intradermálisan, intratekálisan, transzmukozálisan, transzdermálisan, vagy belégzés útján. Az egyik megvalósítási mód szerint az alfa-galaktozidáz A készítménynek egy alanyba való bejuttatása magában foglalja a 0,01-10,0 mg, előnyösen 0,1-5,0 mg per testsúlykg között változó dózisú alfa-galaktozidáz A



készítmény hetente vagy kéthetente való beadását szubkután. Az alfa-galaktozidáz A készítményt beadhatjuk intravénásan is, azaz például intravénás bolus injekcióval, egy lassan benyomott intravénás injekcióval, vagy folyamatos intravénás injekcióval. Bármelyik előzőekben említett módszerben az alfa-galaktozidáz A készítmény beadható egy bejuttató rendszerrel, azaz például egy pumpával, egy kapszulázott sejt bejuttató rendszerrel, liposzómákkal, tűvel való injekciózással, tűmentes injekciózással, nebulizátorral, aeroszolizátorral, elektroporációval és transzdermális tapasszal. Bármelyik előzőekben említett alfa-galaktozidáz A készítmény beadható ezekkel a módszerekkel.

Egy alanyt, akiről feltételezzük, vagy tudjuk, hogy Fabry-betegségben szenved, jelenhető az előzőekben ismertetett alfa-galaktozidáz A készítmény beadásával, az előzőekben említett beadási módszereket és dózisokat használva. A jelen találmány tárgyát képezi általában Fabry-betegségben szenvedő egyedek („Fabry-betegek”), vagy a Fabry-betegség atipusos variánsaiban szenvedő betegek, azaz a Fabry-betegek specifikus populációi, akik főleg kardiovaszkuláris rendellenességben szenvednek mint például ventrikuláris nagyobbodásban, úgymint baloldali ventrikuláris hipertrófiában (LVH), és/vagy mitrális billentyű-elégtelenségben, vagy azok a Fabry betegek, akiknek főleg a veséjével van probléma.

alfa-galaktozidáz A

Az alfa-galaktozidáz A egy homodimer glikoprotein, ami glikolipidekről és glikoproteinekről hidrolizálja a terminális alfa-galaktoziil egységeket.

Az érett „alfa-galaktozidáz A” és „GA-GAL” és „5. számú szekvencia” szakkifejezés (lásd 7. ábra) alfa-galaktozidáz A-t jelent, a szignálpeptid nélkül (a szignálpeptidet tartalmazó alfa-galaktozidáz A-t lásd a 3. ábrán és a 3. számú szekvenciavázlaton). Az „alfa-galaktozidáz A készítmény” szakkifejezést és a „glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény” szakkifejezéseket egymás helyett is használhatjuk, ezek különbözőképpen glikozilezett alfa-galaktozidáz A glikoformákat tartalmaznak.

A „szignálpeptid” szakkifejezés jelentése egy olyan peptid-szekvencia, ami egy újonnan szintetizált polipeptidet, amihez a szignálpeptid hozzá van kapcsolva, az endoplazmatikus retikulumba irányítja további poszt-transzlációs processzálsra és szétosztásra.

A „heterológ szignálpeptid” szakkifejezés jelentése a továbbiakban az alfa-galaktozidáz A összefüggésében egy olyan szignálpeptidet jelent, ami nem a humán alfa-galaktozidáz A szignálpeptidje, tipikus esetben valamelyik, az alfa-galaktozidáz A-tól eltérő emlős fehérje.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a humán alfa-galaktozidáz A DNS szekvenciája (ami lehet cDNS [5. számú szekvencia] vagy genomiális DNS), vagy azok a szekvenciák, amik a humán alfa-galaktozidáz A DNS-től vagy

csendes kodonhasznosítás vagy kodoncsere miatt térnek el, amik konzervatív aminosav helyettesítéseket generálnak, humán sejtek genetikai módosítására használhatók, aminek hatására a sejtek túlexpresszálják és szekretálják az enzimet. Néhány mutáció az alfa-galaktozidáz A DNS szekvenciájában olyan polipeptideket kódolhat, amik megtartják, vagy javított alfa-galaktozidáz A enzimaktivitást mutatnak. Például azt várhatnánk, hogy a konzervatív aminosav helyettesítésnek vagy nincs, vagy csak nagyon kicsi a hatása a biológiai aktivitásra, főleg akkor, ha a fehérjében levő csoportoknak kevesebb mint 10%-át képviseli. A konzervatív helyettesítéseket az alábbi csoportokba tartozó aminosavak között tehetjük meg: glicin, alanin; valin, izoleucin, leucin; aszparaginsav, glutaminsav; aszparagin, glutamin; szerin, treonin; lizin, arginin; és fenilalanin, tirozin [lásd például az 5,356,804 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk].

Fabry-betegség

A Fabry-betegség egy olyan genetikai rendellenesség, amit az alfa-galaktozidáz A enzim tökéletlen működése okoz. Az „alfa-galaktozidáz A deficiencia” szakkifejezés ennek az enzimnek az aktivitásának a csökkenését jelenti egy betegben, ami a neutrális glikolipidek (azaz például a globotriaoszilceramid) abnormális akkumulálódásához vezet a véréredények falában levő hisztiocitákban, angiokeratómákkal a combokon, a a fenéken és a genitáliá-

kon, és hypohidrosist, a végtagokban paresztéziát, a szaruhártya veleszületett verticillatáját és küllőszerű hátsó szubkapszuláris szürkehályogot okoz. Ennek az anyagnak a lerakódása fájdalmat, súlyos vese és keringési betegséget, valamint sztrókot okozhat. A glikolipid akkumulálódás súlyos tüneteket okozhat, ami tipikus esetben megfigyelhető a Fabry-betegségben szenvedő férfiaknál. Egy másik változat szerint az akkumulálódás okozhat enyhe tüneteket is, ami például gyakran látható a defektív gén heterozigóta nő hordozóinál. Az érintett személyek rövidebb élettartamra számíthatnak; a halál általában vese, keringési vagy cerebrovaszkuláris komplikációkból származik, körülbelül negyvenéves korban. Ennek a betegségnek nincs specifikus kezelése. A Fabry-betegség, amit lizoszómális tárolási betegségként osztályoznak, a világban több mint 15000 embert érint.

A Fabry-betegség, az előző definíció szerint egy komplex klinikai tünetegyüttes, amit az jellemez, hogy több szervre és több rendszerre terjed ki. Azokat a betegeket, akikben manifesztálódik a szaruhártya disztrófia, a bőr léziók (angiokeratomata), a fájdalmas neuropátia, az agyi keringési betegség, a kardiomiopátia és a vese működésének rendellenessége, a „klasszikus” fenotípusba osztályozzák. Vannak azonban olyan betegek, amik a klasszikus fenotípusnak csak néhány, nem az összes tünetét mutatják. Ezeket a betegeket osztályozzák „a Fabry-betegség atipikus variánsai” osztályba. Számos atipusos variáns fenotípus kapcsolódik az alfa-galaktozidáz A deficienciához. Például néhány alfa-galaktozidáz A deficienciában szenvedő beteg a Fabry-betegségnek egy



variációjában szenved, ami csak a szívet érinti, azaz például bal ventrikuláris hipertrófiát okoz (LVH). Van másik variáns fenotípus is, amiben a betegeknek csak a veséje károsodott. Bár mindkét említett variáns fenotípust azonosították férfi hemizigótákban, a Fabry-betegség variáns formáit leírták nő heterozigótákban is.

Az atipikus, a szívet érintő variánsban szenvedő betegekben a betegség tünetei az élet későbbi szakaszában jelentkeznek. A szívet érintő variánsban szenvedő betegeknél a diagnózis átlagos kora az 52. életév, szemben a klasszikus fenotípusban szenvedők 29. életévben való diagnosztizálásával [Desnick és mtsai: *In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 6. kiadás, 2741-2784. oldal. szerk.: Scriver és munkatársai, McGraw-Hill (New York) (1996); Meikle és mtsai: *Journal of the American Medical Association* 281, 249-254 (1999)]. Az ebben a szindrómában szenvedő betegek gyakran a szív működés rendellenességének enyhe tüneteit mutatják, azaz például nehéz légzést erőfeszítés közben. A standard echokardiográfiai elemzés általában kideríti, hogy a szívet érintő fenotípusban szenvedő betegek baloldali ventrikuláris hipertrófiában (LVH) vagy aszimmetrikus szeptális hipertrófiában szenvednek. A betegeknek azonban lehet szívizominfarktuszuk vagy kardiomiopátiájuk [Scheidt és mtsai: *The New England Journal of Medicine* 324, 395-399 (1991); Nakao és mtsai: *The New England Journal of Medicine* 333, 288-293 (1995)]. Ezeknél a betegeknél gyakran végeznek szívizom biopsziát, és a variáns szindróma patológiája lényegében hasonlít

a klasszikus Fabry-betegségre; miokardiális beszűrődés, lerakódott glikolipiddel. Ezekben a betegekben az alfa-galaktozidáz A esszével az enzimszintek széles tartománya mérhető. Például a szívet érintő variánsban szenvedő betegekben az alfa-galaktozidáz A enzimaktivitás szintje eléri a normál szint 30%-át is, és ezért eddig nem tekintették őket az alfa-galaktozidáz A pótlási terápia jelöltjeinek.

A feltalálók váratlanul felfedezték, hogy bár az atipikus szív variánsban vagy az atipikus vese variánsban szenvedő betegekben az alfa-galaktozidáz A enzimaktivitás szintje viszonylag magas lehet a klasszikus fenotípusú Fabry-betegségben szenvedő betegekével összehasonlítva, ezeknek a betegeknek is jótékony hatású lehet az alfa-galaktozidáz A enzim terápia. A betegeknek például lehet egy olyan mutációjuk, ami kinetikailag instabil alfa-galaktozidáz A enzimet termel a sejtben, és ezekben a betegekben az alfa-galaktozidáz A enzim szintje szignifikánsan növelhető, ha a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítményeket adjuk be nekik. Emellett néhány, az atipikus, szívet érintő variánsban szenvedő betegben leírták, hogy pontmutációt hordoznak az alfa-galaktozidáz A 215-ös aminosavjánál [Eng és mtsai: Am. J. Hum. Genet. 53, 1186-1197 (1993)]. Tehát ezekben a betegekben hatékony lehet az alfa-galaktozidáz A pótlási terápia, a jelen találmány szerinti, megfelelően glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményekkel. Emellett leírtak atipikus vese variánsban szenvedő betegeket is, akiknél a Fabry-betegség egyedüli klinikai megnyilvánulása az enyhe

proteinuria. A vese biopsziából azonban kiderültek a Fabry-betegségre jellemző tipikus glikolipid zárványok, és az alfa-galaktozidáz A enzim esszéből pedig kiderül a normálisnál alacsonyabb alfa-galaktozidáz A szint. Mivel azonban ezeknél a betegeknél a vesében lerakódott ceramid trihexozid kimutatható a vizelet üledékében levő vese tubuláris sejtekben, a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények beadása lényegesen csökkentheti ezeket a szinteket. A lizoszómális enzimek, azaz például az alfa-galaktozidáz A, egy sejt lizoszómális kompartmentjébe irányulnak, a mannóz-6-P (M6P) receptorral való kölcsönhatás alapján, ami a lizoszómális kompartmentbe szánt enzimek oligoszacharid egységeiben levő M6P egységekhez kötődik [Kornfeld & Mellman: *Ann. Rev. Cell Biol.* 5 483-525 (1989)]. A primer kölcsönhatás a Golgi készülékben jön létre, ahol a Golgi M6P receptorokhoz kötött enzimek szegregálódnak, a lizoszómákba való transzporthoz. Azt gondolják, hogy egy második típusú kölcsönhatás is fellép az extracelluláris alfa-galaktozidáz A és a sejtfelületen levő M6P receptorok között. Azok az enzimek, amik megszöknek az irányító rendszerből, a konstitutív szekréció bioszintézis úton szekretálódnak, és gyakran újra befogják őket a sejtfelszíni M6P receptorok, amik az endocitózis bioszintézis úton keresztül visszaviszik az alfa-galaktozidáz A-t a lizoszómába. A sejtek által internalizált extracelluláris anyagok a citoplazmán keresztül az endocitózis vezikulumokba jutnak, amik fuzionálnak a primer lizoszómával és tartalmukat a lizoszómába ürítik. Ebben a folyamatban a sejtfelszíni M6P receptorok is beépülnek az

endocita vezikulumokba és a lizoszómákba jutnak. Pontosabban, a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A-akat a készítményeket, amikben magas a szialilezés és/vagy a foszforilezés szintje, előnyben részesítjük a Fabry-betegség atipikus variánsában szenvedő betegek kezelésénél. Az ilyen készítmények például minimalizálják az injekciózott alfa-galaktozidáz A-nak azt a frakcióját, amit a hepatociták eltávolítanak, és lehetővé teszik, hogy az alfa-galaktozidáz A-t magas szinten vegyék fel nem-máj sejtek, azaz például vesesejtek, vaszkuláris sejtek, tubuláris sejtek, glomeruláris sejtek, szív miociták és szív vaszkuláris sejtek.

Az M6P csoportokat hordozó extracelluláris alfa-galaktozidáz A kötődhet a sejtfelszíni M6P receptorokhoz, és transzportálható a lizoszómális kompartmentbe. Ha már a lizoszómális kompartmentben van, akkor az alfa-galaktozidáz A képes elvégezni a megfelelő feladatokat. A lizoszómális enzim-mozgásnak ez az aspektusa, ami az alfa-galaktozidáz A enzim pótlási terápiát a Fabry-betegségben szenvedők megfelelő terápiás kezelésévé teszi. Így, még akkor is, ha egy sejt genetikailag hibás az alfa-galaktozidáz A előállításában, a sejt képes felvenni az extracelluláris alfa-galaktozidáz A-t, ha az alfa-galaktozidáz A megfelelően glikozilezve van, és a hibás sejt M6P receptort hordoz. A Fabry-betegségben szenvedő betegekben a vese és a szív vaszkuláris endoteliális sejtjei súlyos hisztópatológiai rendellenességeket mutatnak, és hozzájárulnak a betegség klinikai patológiájához. Ezek a sejtek, amik M6P receptorokat hordoznak, az alfa-galaktozidáz A

fő terápiás célpontjai. A jelen találmány tárgya továbbá olyan alfa-galaktozidáz A készítmény biztosítása, amiben az M6P N-kapcsolt oligoszacharidokban van jelen.

Annak mértéke, hogy az alfa-galaktozidáz A N-kapcsolt oligoszacharidjai milyen mértékben módosulnak a szialilezés révén, lényeges hatással van az alfa-galaktozidáz A farmakokinetikájára és biológiai megoszlására. A megfelelő szialilezés hiányában az alfa-galaktozidáz A gyorsan kiürül a keringésből, annak következtében, hogy kötődik a hepatikus aszialoglikoprotein receptorokhoz (Ashwell receptorok), amit internalizáció és a hepatociták által való lebontás követ [Ashwell & Harford, *Annu. Rev. Biochem.* 51, 531-554 (1982)]. Ez csökkenti az alfa-galaktozidáz A-nak a keringésben levő mennyiségét, ami ahhoz kell, hogy azokon a sejteken levő M6P receptorokhoz kötődjön, amik hozzájárulnak a Fabry-betegség klinikai patológiájához, ilyenek például a vese és a szív vaszkuláris endoteliális sejtjei. A genetikailag módosított humán sejtek által szekretált alfa-galaktozidáz A sejtek olyan glikozilezési tulajdonságokkal rendelkeznek, amik megfelelnek a Fabry-betegség kezelésének, akár a tisztított szekretált fehérje hagyományos gyógyszerészeti beadását alkalmazzuk, akár génterápiát, anélkül hogy további enzimatiszításra lenne szükség, amint azt leírták a glükocerebrozidáz nevű lizoszómális enzim esetében, aholis a tisztított glükocerebrozidáz enzim klinikailag releváns sejtek által való felvétele az enzim komplex enzimatiszítását követeli meg a humán méhlepényből



való izolálás után [Beutler: The New England Journal of Medicine 325, 1354-1360 (1991)].

Az alfa-galaktozidáz A termelésére alkalmas sejtek

Egy beteget, akiről feltételezzük, hogy alfa-galaktozidáz A deficienciában, azaz Fabry-betegségben szenved kezelhető tenyésztett, genetikailag módosított sejtekből, előnyösen humán sejtekből származó tisztított humán alfa-galaktozidáz A-val.

Ha a sejteket a Fabry-betegség kezelése céljából kell módosítanunk genetikailag, akkor a sejteket hagyományos génszerkezeti módszerekkel, vagy génaktiválással módosíthatjuk.

A hagyományos módszerek szerint egy DNS molekula, ami tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A cDNS vagy genomiális szekvenciát, lehet egy expressziós konstrukcióban, és standard módszerekkel transzfektálható primer, szekunder vagy örökéletűvé tett sejtekbe, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a liposzómák, polibrén, vagy DEAE dextrán segítségével végzett transzfekciót, elektroporációt, kalcium-foszfátos kicsapást, mikroinjekciózást, vagy nagysebességgel belőtt mikrorészecskéket („biolisztika”) (lásd például az USSN 08/334,797 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk). Egy másik változat szerint egy olyan rendszert használhatunk, ami a genetikai információt egy virális vektorral juttatja be. Azok közé a vírusok közé, amikről ismert, hogy jól használhatók géntranszferre, tartoznak az adenovírusok, az adeno-asszociált



vírusok, a herpeszvírus, a mumpszvírus, a gyermekbénulás vírus, a retrovírusok, a Sindbis vírus, és a vakcinia vírus, azaz például a kanárihimlő vírus.

Egy másik változat szerint a sejtek génaktiválással („GA”) módosíthatók, aminek a leírása megtalálható az 5,733,761 és 5,750,476 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. A génaktiválással előállított alfa-galaktozidáz A-t a továbbiakban GA-GAL néven említjük.

Ennek megfelelően a „genetikailag módosított” szakkifejezés jelentése a továbbiakban olyan sejtekre vonatkozik, amik egy adott génterméket expresszálnak a génterméket kódoló és/vagy a génterméket kódoló szekvencia expresszióját szabályozó elemeket tartalmazó DNS molekula bejuttatása után. A DNS molekulát bejuttathatjuk gén-célzással, vagy homológ rekombinációval, azaz a DNS molekulának egy adott genomiális pontba való bejuttatásával. Homológ rekombináció használható magának a hibás génnek a helyettesítésére (a hibás alfa-galaktozidáz A gént, vagy annak egy részét a Fabry-betegségben szenvedő betegek saját sejtjeiben helyettesíthetjük a teljes génnel, vagy annak egy részével).

A továbbiakban a „primer sejt” szakkifejezés olyan sejteket jelent, amik egy gerinces szervezet szövetéből izolált sejtszuszpenzióban vannak (mielőtt, széleszteniék, azaz letapadna egy szövettenyészet hordozóhoz, azaz például lemezhez vagy palackhoz), vagy egy szövetből származó explantumban levő



sejtek, és az előzőekben említett sejtek mindkét típusa először van szélesztve, és a sejtszuspenziók ezekből a szélesztett sejtekből származnak.

A „szekunder sejt” szakkifejezés a tenyésztés összes további lépéséből származó sejteket jelent. Azaz az első alkalommal, amikor a szélesztett primer sejteket eltávolítjuk a tenyésztet hordozóból és újra szélesztjük (passzáljuk), akkor a sejtet szekunder sejtneként említjük, ugyanúgy, mint a többi passzálásból származó sejteket.

A „sejt törzs” olyan szekunder sejteket tartalmaz, amiket egyszer vagy kétszer már passzáltak, az átlag-populáció véges számú kettőződésre képes tenyészetben; kontakt-gátlásos, rögzítés-függő növekedési tulajdonságokat mutatnak (azoknak a sejteknek a kivételével, amiket szuszpenziós tenyésztetben szaporítunk); és nem örökéletűek.

Az „örökéletűvé tett sejt” szakkifejezés egy megállapodott sejtvonalból származó sejtet jelent, ami láthatóan végtelen élet-tartammal rendelkezik tenyészetben.

A primer vagy szekunder sejtek lehetnek fibroblasztok, epitheliális sejtek, beleértve az emlő és bél epitheliális sejteket, endotheliális sejtek, a vér alakos elemei, beleértve a limfocitákat és a csontvelő sejteket, gliasejtek, hepatociták, keratinociták, izomsejtek, idegsejtek, vagy ezeknek a sejteknek a prekursorai. A jelen találmányban jól használható, örökéletűvé tett humán sejtvonalek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a Bowes Melanoma sejtek (ATCC letéti szám CRL 9607), a



Daudi sejtek (ATCC letéti szám CCL 213), a HeLa sejtek és a HeLa sejtek származékai (ATCC letéti számok CCL 2, CCL 2.1, és CCL2.2), a HL-60 sejtek (ATCC letéti szám CCL 240), a HT-1080 sejtek (ATCC letéti szám CCL 121), a Jurkat sejtek (ATCC letéti szám TIB 152), a KB karcinóma sejtek (ATCC letéti szám CCL 17), a K-562 leukémia sejtek (ATCC letéti szám CCL 243), az MCF-7 emlőrák sejtek (ATCC letéti szám BTH 22), a MOLT-4 sejtek (ATCC letéti szám 1582), a Namalwa sejtek (ATCC letéti szám CRL 1432), a Raji sejtek (ATCC letéti szám CRL 86), az RPMI 8226 sejtek (ATCC letéti szám CCL 155), az U-937 sejtek (ATCC letéti szám CRL 1593), a WI-38VA13 alvonal 2R4 sejtek (ATCC letéti szám CLL 75,1), a CCRF-CEM sejtek (ATCC letéti szám CCL 119) és a 2780AD petefészek karcinóma sejtek [Van der Blick és mtsai: Cancer Res. 48, 5927-5932 (1988)], valamint azok a heterohibridóma sejtek, amiket humán sejtek és más fajok sejtjei közötti fúzióval lehet előállítani.

A humán olyan jellegű módosítása után, hogy egy olyan sejtet állítsunk elő, ami alfa-galaktozidáz A-t szekretál, előállíthatunk egy olyan klonális sejt törzset, ami lényegében genetikailag azonos, tenyésztett primer humán sejtek sokaságából áll, vagy ha a sejteket örökéletűvé tettük, akkor egy olyan klonális sejt vonalat, ami lényegében genetikailag azonos, örökéletűvé tett humán sejtek sokaságából áll. Az egyik megvalósítási mód szerint a klonális sejt törzs vagy a klonális sejt vonalak fibroblasztok. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a sejtek szekunder humán fibroblasztok, azaz például BRS-11 sejtek.



A genetikai módosítás után a sejteket az alfa-galaktozidáz A szekrécióját lehetővé tevő körülmények között tenyésztjük. A fehérjét a tenyésztett sejtekből úgy izoláljuk, hogy összegyűjtjük azt a közeget, amiben a sejtek szaporodtak, és/vagy lizáltatjuk, hogy tartalmuk kiszabaduljon, majd fehérjetisztítási technikákat alkalmazunk.

Az alfa-galaktozidáz A tisztítása stabilan transzfektált sejtek kondicionált közegéből

A jelen találmány szerinti módszerek alapján az alfa-galaktozidáz A fehérjét a tenyésztett sejtekből („alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtek”) úgy izoláljuk, hogy összegyűjtjük azt a közeget, amiben a sejtek szaporodtak, vagy lizáltatjuk, hogy tartalmuk kiszabaduljon, majd fehérjetisztítási technikákat alkalmazunk, amiben nincs lektin affinitáskromatográfia. Az előnyben részesített tisztítási eljárás az alábbi, 2. példában ismertetjük.

Alternatív, hidrofób kölcsönhatáson alapuló gyanták, azaz például a Source Iso (Pharmacia), a Macro-Prep Methyl Support (Bio-Rad), a TSK Butyl (Tosohaas) vagy a Phenyl Sepharose (Pharmacia) is használhatók az alfa-galaktozidáz A tisztítására. Az oszlopot viszonylag magas koncentrációjú sóoldattal, azaz például 1 mol/l ammónium-szulfáttal vagy 2 mol/l nátrium-kloriddal hozhatjuk egyensúlyba, pH=5,6-os pufferben. A tisztítandó mintát úgy készítjük elő, hogy a pH-t és a sókoncentrációt az egyensúlyba hozó puffernek megfelelően állítjuk be. A mintát felvisszük az oszlopra, majd az oszlopot a megkötetlen anyag eltávolítására az egyensúlyba hozó pufferrel mossuk. Az alfa-galakto-



zidáz A-t kisebb ionerősségű pufferrel, azaz például vízzel vagy vízben oldott szerves oldószerekkel, azaz például 20%-os etanollal vagy 50%-os propilénlikollal eluáljuk. Egy másik változat szerint el lehet érni, hogy az alfa-galaktozidáz A átfolyjon az oszlopon, kisebb sókoncentrációt használva az egyensúlyba hozó pufferben és a mintában, vagy más pH-t használva. Más fehérjék kötődhetnek az oszlophoz, ezzel az alfa-galaktozidáz A-t tartalmazó minta tisztítását úgy érve el, hogy az nem kötődik az oszlophoz. Egy előnyben részesített első tisztítási lépés a hidroxipapírt oszlop használata.

A tisztítás egy alternatív lépésében az alfa-galaktozidáz A tisztítására kationcserélő gyantát használhatunk, azaz SP Sepharose 6 Fast Flow gyantát (Pharmacia), Source 30S (Pharmacia), CM Sepharose Fast Flow (Pharmacia)), Macro-Prep CM hordozó (Bio-Rad) vagy Macro-Prep High S Support (Bio-Rad) gyantát. Az „első kromatográfiás lépés” azt jelenti, hogy egy mintát először visszünk kromatográfiás oszlopra (az összes, a minta előkészítéséhez használt lépést kihagyva). Az alfa-galaktozidáz A pH=4.4-en képes az oszlophoz kötődni. Az oszlop egyensúlyba hozására puffer használható, azaz például egy 10 mmol/l-es nátrium-acetát, pH=4,4 puffer, vagy 10 mmol/l nátrium-citrát, pH=4,4 puffer, vagy más, pH=4,4-en megfelelő pufferkapacitással rendelkező puffer. A tisztítandó mintának a pH-ját és ionerősségét az egyensúlyba hozó puffer pH-jára és ionerősségére állítjuk be. A mintát felvisszük az oszlopra, majd az oszlopot a felvitel után mossuk, hogy eltávolítsuk a megkötetlen anyagot. Só, azaz például nátrium-klorid vagy kálium-klorid használható az alfa-galaktozidáz A-nak az oszlopról való eluálására. Egy másik változat szerint az alfa-galaktozidáz A az oszlopról magas pH-



jú pufferrel, vagy magasabb sókoncentráció és magasabb pH kombinációjával eluálható. Azt is megtehetjük, hogy a felvitel során az alfa-galaktozidáz A átfolyjon az oszlopon, ha növeljük a sókoncentrációt az egyensúlyba hozó pufferben és a felvitt mintában, vagy az oszlop magasabb pH-n való futtatásával, vagy a magasabb sókoncentráció és a magasabb pH kombinálásával.

A tisztítás egy másik lépésében az alfa-galaktozidáz A tisztítására Q Sepharose 6 Fast Flow-t használhatunk. A Q Sepharose 6 Fast Flow egy viszonylag erős anioncserélő gyanta. Egy gyengébb anioncserélő, azaz például a DEAE Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia) vagy a Macro-Prep DEAB (Bio-Rad) is használható az alfa-galaktozidáz A tisztítására. Az oszlopot egyensúlyba hozzuk egy pufferrel, azaz például 10 mmol/l nátriumfoszfáttal, pH=6. A minta pH-ját 6-ra állítjuk, majd kis ionerősséget kapunk, a minta hígításával vagy diaszûrésével. A mintát olyan körülmények között visszük az oszlopra, hogy alfa-galaktozidáz A megkössön. Az oszlopot egyensúlyba hozó pufferrel mossuk, hogy eltávolítsuk a megkötetlen anyagot. Az alfa-galaktozidáz A-t sóoldattal, azaz például nátrium-kloriddal vagy kálium-kloriddal, vagy alacsonyabb pH alkalmazásával, vagy a magasabb sókoncentráció és az alacsonyabb pH kombinálásával eluálható. Azt is megtehetjük, hogy a felvitel során az alfa-galaktozidáz A átfolyjon az oszlopon, ha növeljük a sókoncentrációt a felvitt mintában, vagy az oszlop alacsonyabb pH-n való futtatásával, vagy a magasabb sókoncentráció és az alacsonyabb pH kombinálásával.

Egy másik tisztítási lépésben Superdex 200 (Pharmacia) méretkizárásos kromatográfiát használunk az alfa-galaktozidáz A tisztítására. Más méretkizárásos kromatográfiás gyanták, azaz

például Sephacryl S-200 vagy Bio-Gel A-1.5 m is használható az alfa-galaktozidáz A tisztítására. A méretkizárásos kromatográfiához az előnyben részesített puffer 25 mmol/l nátriumfoszfát, pH=6,0, ami 0,15 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Más, a kiszerezési formával kompatibilis pufferek is használható, azaz például 10 mmol/l nátrium- vagy kálium-citrát. A puffer pH-ja pH=5 és 7 között lehet, és tartalmaznia kell egy sót, azaz például nátrium-kloridot vagy nátrium-klorid és kálium-klorid keverékét.

A tisztítás egy másik lépésében kromatofókuszáló gyantát, azaz például Polybuffer Exchanger PBE 94-et (Pharmacia) használunk, az alfa-galaktozidáz A tisztítására. Az oszlopot viszonylag magas pH-n (azaz pH=7-en vagy magasabb értéken) hozzuk egyensúlyba, a tisztítandó minta pH-ját ugyanarra a pH-ra állítjuk, majd a mintát felvisszük az oszlopra. A fehérjéket pH=4-ig csökkenő pH gradienssel eluáljuk, egy pufferrendszer, azaz például Polybuffer 74 (Pharmacia) használatával, aminek a pH-ját 4-re állítottuk.

Egy másik változat szerint immunaffinitás kromatográfia használható az alfa-galaktozidáz A tisztítására. Egy megfelelő, alfa-galaktozidáz A elleni poliklonális vagy monoklonális ellenanyagot (amit alfa-galaktozidáz A-val, vagy az alfa-galaktozidáz A szekvenciából származó peptiddel való immunizálással állítunk elő, standard technikák alkalmazásával) egy aktivált kapcsoló gyantára, azaz például NHS-aktivált Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) vagy brómcíánnal aktivált Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) gyantára immobilizálunk. A tisztítandó mintát az

immobilizált ellenanyag oszlopra körülbelül $\text{pH}=6-7$ között visszük fel. Az oszlopot mossuk, hogy eltávolítsuk a megkötetlen anyagot. Az alfa-galaktozidáz A-t az oszlopról az affinitás-oszlop eluálására tipikus esetekben használt reagensekkel eluáljuk, azaz például alacsony (3-as) pH -val, denaturáló szerrel, azaz például guanidin HCl-lel vagy tiocianáttal vagy szerves oldószerrel, azaz például 50%-os propilénglikollal, $\text{pH}=6$ -os pufferben. A tisztítási eljárásban az alfa-galaktozidáz A tisztítására használhatunk fémkelát affinitás gyantát, azaz például Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia) gyantát. Az oszlopot előre feltöltjük fémionokkal, azaz például Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} vagy Cd^{2+} ionokkal. A tisztítandó mintát a megfelelő pH -, azaz például $\text{pH}=6-7,5$ értéken visszük fel az oszlopra, majd az oszlopot mossuk, hogy eltávolítsuk a megkötetlen fehérjét. A megkötött fehérjét kompetitív elúcióval eluáljuk, hisztidint vagy imidazolt vagy csökkentett pH -t (amit nátrium-citráttal vagy nátrium-acetáttal lehet elérni 6-nál kisebb pH esetében), vagy kelátképző ágensek, azaz például EDTA vagy EGTA bevitelét alkalmazva.

Az előzőekben ismertetett protokollok alapján a jelen találmány tárgyát olyan készítmények képezik, amikben az alfa-galaktozidáz A tisztább, mint a szakterületen korábban ismert készítményekben, legalább 98%-os homogenitásra, előnyösebben legalább 99%-os homogenitásra, és legelőnyösebben legalább 99,5%-os homogenitásra tisztítva, SDS-PAGE-val vagy fordított fázisú HPLC-vel végzett mérés alapján. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények tartalmazhatnak számos külön-

böző alfa-galaktozidáz A glikoformát. Ennek megfelelően a „homogenitás” szakkifejezés jelentése a továbbiakban az alfa-galaktozidáz A készítményekkel összefüggésben olyan készítményekre vonatkozik, amik lényegében mentesek (<2% összfehérje) minden más nem alfa-galaktozidáz A fehérjétől. A nem-alfa-galaktozidáz A fehérjék például az albumin, a gazdasejt által termelt nem-alfa-galaktozidáz A fehérjék, és az állati szövetből vagy folyadékból izolált nem-alfa-galaktozidáz A fehérjék. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények specifikus aktivitása előnyösen legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, még előnyösebben legalább $3,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és legelőnyösebben legalább $3,5 \times 10^6$ egység/mg fehérje.

Az alfa-galaktozidáz A készítmény keringési gelezési idejének javítása a glikán átalakításával, az oligoszacharid töltésének növelése érdekében

A jelen találmány tárgyát képezi egy glikoprotein módosítási program, amivel meg lehet növelni egy terápiás enzim bejutásának mértékét a májtól és makrofágoktól eltérő specifikus szövetekbe. A jelen találmány szerinti eljárások használatával humán alfa-galaktozidáz A készítményeket kapunk, amikben az oligoszacharidok 35-85%-a töltve van, az oligoszacharidoknak előnyösen legalább 50%-a töltéssel rendelkezik.

A fehérje N-glikozilezés úgy működik, hogy a fehérjék megfelelő aszparagin csoportjait oligoszacharid struktúrákkal módosítjuk, ezzel befolyásolva tulajdonságaikat és biológiai aktivitásukat. [Kukuruzinska & Lennon: Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 9,

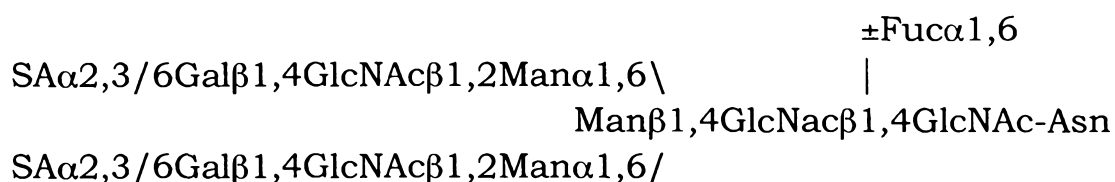
415-448 (1998)]. A jelen találmány tárgyát izolált alfa-galaktozidáz A készítmény képezi, amiben az oligoszacharidok nagy százaléka negatív töltéssel rendelkezik, főleg egy vagy négy szíálsav csoportnak a komplex glikánokhoz való hozzáadása, vagy egy vagy két foszfát egységnek a magas mannóztartalmú glikánokhoz való hozzáadása miatt, illetve egy foszfát és egyetlen szíálsav csoportnak a hibrid glikánokhoz való hozzáadása miatt. A szulfatált komplex glikánok kisebb mennyisége is jelen lehet. A töltött struktúrák nagy részaránya két fő funkciót szolgál. Először, az utolsó galaktóz csoportok 2,3- vagy 2,6-kapcsolt szíálsavval való lezárása megakadályozza a keringésből idő előtt való kivonását, amit a hepatocitákon levő aszialoglikoprotein receptor végez el. Ez a receptor felismeri a terminális galaktóz csoportokat tartalmazó glikoproteineket. Ha megnöveljük az alfa-galaktozidáz A keringési felezési idejét, akkor ez fontos célszerveknek, azaz például a szívnek és a vesének lehetővé teszi, hogy az enzim infúzió után a plazmából nagyobb mennyiségű enzimet bekebelezzen. Másodszor, a Man-6-foszfát jelenléte a magas mannóztartalmú vagy hibrid glikánokon lehetőséget biztosít a kation-független Man-6-foszfát receptornak (CI-MPR) a receptor által közvetített felvételre. Ez a receptor által közvetített felvétel számos sejt felszínén játszódik, beleértve a vaszkuláris endoteliális sejteket is, amik a CTH fő tárolási helyei a Fabry-betegségekben. A két Man-6-foszfát csoportot tartalmazó enzim-molekuláknak sokkal nagyobb az affinitásuk a CI-MPR-hez, mint azoknak, amik csak

egyetlen Man-6-foszfátot tartalmaznak. A jellegzetes glikán-struktúrákat az 1. táblázatban adjuk meg.

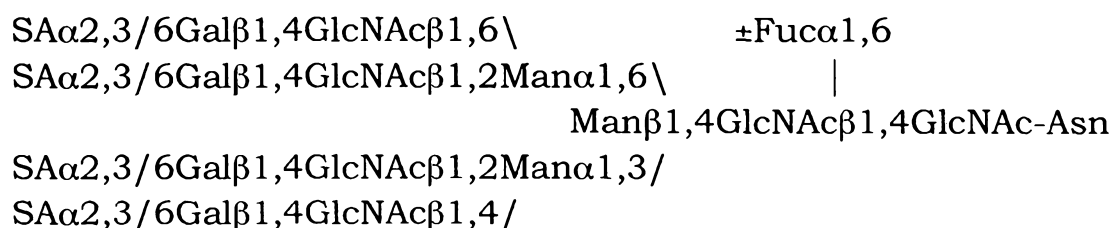
1. Táblázat

Reprezentatív glikán struktúrák

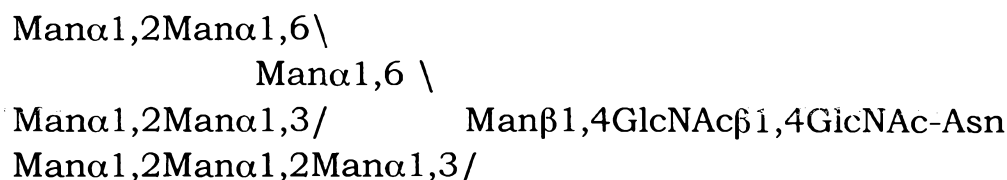
Kétágú glikán



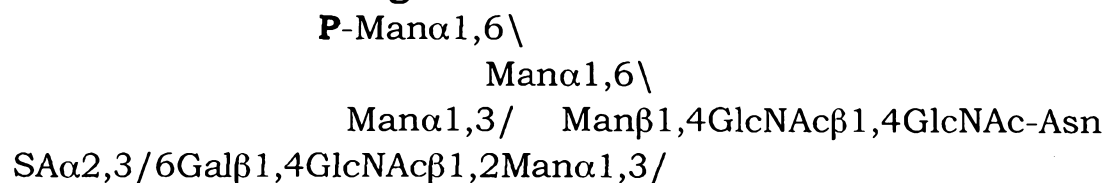
Négyágú glikán



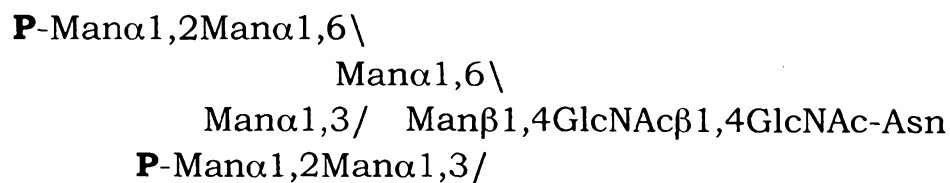
Magas mannóztartalmú glikán



Foszforilezett hibrid glikán

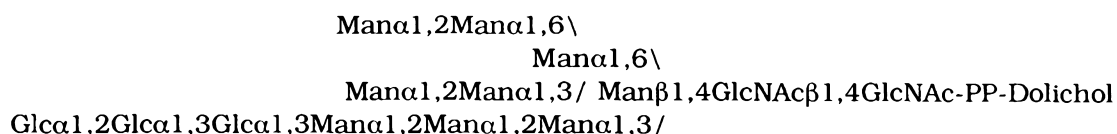


Bifoszforilezett glikán



Az N-glikoprotein bioszintézisében számos különböző enzim, glikoziltranszferáz és glikozidáz vesz részt. Ezeknek az enzimeknek a legnagyobb része az endoplazmatikus retikulumban (ER) és a Golgi készülékben funkcionál, rendezett, jól szervezett módon. Az N-glikozilezés komplexitását erősíti az a tény, hogy ugyanabban a polipeptidben a különböző aszparagin csoportok módosíthatók a különböző oligoszacharid struktúrákkal, és a különböző fehérjéket a szénhidrát egységeik jellemzői különböztetik meg. A molekuláris genetika legújabb eredményei meggyorsították az N-glikozilezési gének azonosítását, izolálását és jellemzését. Ennek eredményeképpen kaptuk az N-glikozilezés és más celluláris funkciók közötti kapcsolatra vonatkozó információkat.

A sejtben az N-kapcsolt glikoprotein processzálás akkor kezdődik, amikor egy $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -t tartalmazó oligoszacharid lánc egy egységként hozzákapcsolódik az ER lumenében levő naszcens peptid akceptor aszparaginjához. Egy tizennégy cukorból álló oligoszacharid, ami $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -t tartalmaz, épül fel a dolicholon, egy nagyon hosszú alifás alkoholon:



Ez az oligoszacharid egyetlen egységként megy át egy akceptor aszparagin csoportra az ER lumenében levő naszcens peptidláncban. A glikánnak a peptidhez viszonyított nagy mérete vezetheti a fehérje térszerkezetének a kialakulását. A három glikozid szolgál annak szignáljaként, hogy az oligoszacharid teljes,

és készen áll arra, hogy az oligoszacharil transzferáz átvigye. Ez az enzim emellett átvisz nem-glikozilezett oligoszacharidokat is, de ennek sebessége csak egy töredéke a komplett lánc átviteli sebességének, mivel ezek nem optimális szubsztrátok. A szénhidrát-deficiens glikoprotein szindróma egy formájáról emberekben kimutatták, hogy a Dolichol-P-Glc:Man₉GlcNAc₂-PP-Dolichol glükozil-transzferáz károsodása okozza, ami a glükóz hozzáadás bioszintézis útnak az első enzime, ami a szérum-fehérjék hipoglikozilezését eredményezi [Korner és mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 13200-13205 (1998)]. A három glükóz-csoport eltávolítása, és a helyes konformáció kialakulása után az újonnan szintetizált glikoprotein a Golgi készülékbe exportálódik. Attól függően, hogy a fehérje térszerkezetének kialakulása után a Golgi mannozidázok mennyire férnek hozzá a glikánhoz, a glikán lánc megmaradhat magas mannóztartalmú láncnak, ami 5-9 mannózcsoporthat tartalmaz. Egy másik változat szerint a glikán lánc tovább processzálódhat egy trimannozil maggá, és más glükozil transzferázok akceptora lehet, amik komplex láncokat képeznek több GlcNAc csoportok, majd Gal, NeuAc és Fuc csoportok hozzáadásával. Egy harmadik lehetőség az, ha a fehérjének két lizincsoportja van, egymástól pontosan 34 Angström távolságban, és egy magas mannóztartalmú lánchoz viszonyítva helyes térállásban, akkor GlcNAc α -1-PO₄ adódik az egyik, vagy néha mindkét mannózcsoporthat 6-os szénatomjához [Cuzzo és mtsai: Journal of Biological Chemistry 273, 21069-21076 (1998)]. Miután az α -kapcsolt GlcNAc-t egy specifikus enzim eltávolította, egy terminális M6P epitop generálódik, amit a transz Golgi hálózatban egy M6P receptor felismer, és ez ezeket

az enzimeket mezenchimális eredetű sejtekben levő lizoszómákba irányítja.

Ahhoz, hogy az alfa-galaktozidáz A-t a lehető legtöbb szövetbe eljuttassuk, számos különböző szénhidrát struktúra (glikoforma) használható. Matsuura és munkatársai leírták, hogy a CHO sejtekben készített humán alfa-galaktozidáz A-n a glikán struktúrák 41%-ban magas mannóztartalmú glikánok, és a foszforilezési szint 24% [Matsuura és mtsai: *Glycobiology* **8**, 329-339 (1998)]. Azonban a szialilezett komplex glikánok szintje csak 11%. Tehát a komplex láncok 2/3-a nincs szialilezve, ami azt eredményezi, hogy az alfa-galaktozidáz A gyorsan kiürül a májon keresztül. A jelen találmány szerinti humán sejtekben termelt alfa-galaktozidáz A nagyobb százalékban tartalmaz töltött oligoszacharidot mint a szakterületen korábban CHO sejtekben előállított alfa-galaktozidáz A. Például az itt ismertetett HT-1080 sejtekben szintetizált alfa-galaktozidáz A különösen alkalmas, mivel a HT-1080 sejtekben termelt alfa-galaktozidáz A körülbelül 15% neutrális struktúrát tartalmaz (magas mannóz-tartalmú és hibrid), körülbelül 16% foszforilezett glikánt, és körülbelül 67% komplex glikánt tartalmaz, 2-4 szialilezett csoporttal. Tehát lényegében az összes komplex lánc szialilezve van, ha a CHO sejtekben előállított alfa-galaktozidáz A-val hasonlítjuk össze. A HT-1080 sejtben termelődött alfa-galaktozidáz A-nak három N-kapcsolt glikozilezési helye van. Két hely komplex glikánná processzálódik a Golgi apparátusban, míg a harmadik helyet egy magas mannóztartalmú glikán foglalja el, aminek 50%-át a lizoszómális enzim-specifikus foszforilezés módosítja, ezzel monofoszforilezett és difoszforilezett fajtákat állítva elő.

Egy N-kapcsolt glikán láncokat tartalmazó fehérjén a szénhidrátok módosításának négy megközelítési módja van. Először, a töltött alfa-galaktozidáz A aránya növelhető, ha a tisztítási eljárás során szelektíven izoláljuk a glikoformákat. A jelen találmány tárgyát képezi a nagyobb töltésű és magasabb molekulásúlyú alfa-galaktozidáz A glikoformák arányának növelése, az alfa-galaktozidáz A fajták kromatográfiás oszlopokba töltött gyantákon való frakcionálásával, a tisztítás során és/vagy után. Minél nagyobb a töltése az alfa-galaktozidáz A fajtáknak, annál több szíálsavat és/vagy foszfátot tartalmaznak, és minél magasabb a glikoformák molekulásúlya, annál inkább tartalmaznak teljesen glikozilezett, sok elágazást tartalmazó és erősen töltött fajtákat. A töltött fajták kiválasztása, vagy a nem-glikozilezett, gyengén glikozilezett, vagy gyengén szíálelezt és/vagy foszforilezt alfa-galaktozidáz A fajtáknak az eltávolítása olyan alfa-galaktozidáz A glikoforma populációt eredményez, ami több szíálsavat és/vagy több foszfátot tartalmaz, ezzel egy magasabb felezési idejű és potenciális terápiás hatással rendelkező alfa-galaktozidáz A készítményt biztosítva.

Ez a frakcionálási eljárás lejátszódhat, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, megfelelő kromatográfiás oszlopba töltött gyantákon, amiket alfa-galaktozidáz A izolálására használnak. A frakcionálás létrejön például, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, kationcserélő gyantákon (azaz például SP-Sepharose-on), anioncserélő gyantákon (Q-Sepharose), affinitás-gyantákon (Heparin Sepharose), méretekizárásos oszlopokon (Superdex 200) és hidrofób kölcsönhatáson alapuló oszlopokon (Butyl Sepharose), valamint más, a szakterületen ismert kromatográfiás oszlopokon.

Mivel az alfa-galaktozidáz A-t a sejtek glikoformák heterogén keverékeként termeli, amiknek eltér a molekulasúlyuk és a töltésük, az alfa-galaktozidáz A hajlamos arra, hogy viszonylag széles csúcsokban eluálódjon a kromatográfiás gyantákról. Ezekben az elúciókban a glikoformák meghatározott módon oszlanak meg, a használt gyanta természetétől függően. Például a méretkizárásos kromatográfia esetében a legnagyobb glikoformák hajlanak arra, hogy az elúciós profilban korábban eluálódjanak mint a kisebb glikoformák.

Az ioncserélő kromatográfiában a legnagyobb negatív töltéssel rendelkező glikoformák hajlanak arra, hogy a pozitívan töltött gyantához (azaz például a Q-Sepharose-hoz) nagyobb affinitással kötődjenek mint a kisebb negatív töltésű glikoformák, ennek következtében az elúciós profilban később eluálódnak. Ezzel szemben ezek az erős negatív töltésű glikoformák kevésbé erősen kötődnek egy negatívan töltött gyantához, azaz például az SP Sepharose-hoz, mint a kisebb negatív töltésű fajták, vagy éppen egyáltalán nem kötődnek.

A kromatográfiás gyantákon a glikoforma fajták frakcionálása befolyásolható a pH-val, az ionerősséggel, a puffer sójának kiválasztásával, a viszkozitással és/vagy más paraméterekkel, azaz például a gyantatípus kiválasztásával. A különböző típusú gradiens elúciók (egyenesszal, lineáris gradiens, görbe, azaz például exponenciális gradiens) kiválasztása, vagy egy sor rövid elúciós lépés használata az alfa-galaktozidáz A selektív eluálására a kromatográfiás oszlopról, szintén optimalizálható az alfa-galaktozidáz A frakcionáláshoz. Mindegyik ilyen faktor, egyedül, vagy kombinációban, optimalizálható, hogy

elérjük a glikoformák hatékony frakcionálását. A frakcionálás azután is előfordul, hogy a tisztítási eljárás befejeződött, egy olyan kromatográfiás gyantán, amit szelektíven optimalizáltunk a frakcionálásra és a kívánt glikoforma populáció szelektálására.

A glikoform populációk szelektálása a frakcionált alfa-galaktozidáz A fajokról megtehető az eluált alfa-galaktozidáz A glikoformák elemzése után. Az elúciós csúcs különböző technikákkal, azaz például, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, SDS-PAGE-val, izoelektromos fókuszálással, kapilláris elektroforézissel, analitikai ioncserélő HPLC-vel és/vagy analitikai méretkizárásos HPLC-vel. Kiválaszthatók azok a frakciók, amik leginkább megfelelnek a kívánt méretnek vagy töltésprofilnak. A szelekció előfordulhat az eljárás mindegyik kromatográfiás lépésében, ami lehetővé teszi a kívánt glikoforma populáció elérését, vagy egy adott lépésre vagy lépésekre korlátozható, ha a lépések frakcionálási hatásfoka magas. A frakcionálás azután is megtörténhet, hogy a tisztítási lépést befejeztük, egy olyan kromatográfiás gyantán, amit szelektíven optimalizáltunk a frakcionálásra és a kívánt glikoforma populáció szelektálására.

Az alfa-galaktozidáz A erősen töltött és/vagy magas molekulású glikoformáinak szelektálását bármilyen alfa-galaktozidáz A készítménnyel elvégezhetjük, például genetikailag módosított sejtekből származó alfa-galaktozidáz A-val, amely genetikai módosítás lehet hagyományos génsebészeti beavatkozás vagy génaktiválás (GA). Optimalizált rendszerekben szaporított sejtvo-

nalakon hajtható végre, hogy az előzőkben ismertetett módon magasabb szialilezést és foszforilezést kapjunk, vagy az előzőkben ismertetett pegilezett alfa-galaktozidáz A-val.

Például az itt ismertetett alfa-galaktozidáz A tisztítási eljárásban az alfa-galaktozidáz A glikoformák frakcionálása az eljárás különböző lépéseiben fordulhat elő. A hidrofób gyantán (Butyl Sepharose Fast Flow) a legnagyobb töltésű alfa-galaktozidáz A glikoformák eluálódnak először, ezeket követik a kisebb töltésű fajták. A Heparin Sepharose esetében a legnagyobb töltésű fajták szintén elsőként eluálódnak az elúciós csúcsban, ezeket követik a kisebb töltésű fajták. A Superdex 200 méretkizárásos kromatográfia esetében először a legnagyobb molekulásúlyú glikoformák eluálódnak, ezeket követik az alacsonyabb molekulásúlyú, kevésbé glikozilezett alfa-galaktozidáz A fajták. Hogy lehetővé tegyük az adott alfa-galaktozidáz A glikoforma populációk hatékony frakcionálását, több kromatográfiás lépés kombinálható, amik mind más-más fizikai elvek alapján frakcionálnak. Például ahhoz, hogy megkapjuk a legkisebb pI értékű (azaz a legnagyobb negatív töltésű) alfa-galaktozidáz A glikoformákat, az egyesítést a korai eluáló butil frakciókra korlátozva növelhetjük az erősebben töltött alfa-galaktozidáz A mennyiségét. Ha ezt a szelektált pool-t Heparin oszlopra visszük, majd a pool-ozást megint csak a korai, nagyobb negatív töltésű alfa-galaktozidáz A-ra korlátozva, ez tovább növeli az alacsony pI értékű alfa-galaktozidáz A glikoformák arányát a pool-ban. A glikoforma populáció további finomhangolása elvégezhető a tisztítási eljárás különböző

lépéseiben, ha SDS-PAGE-val vagy izoelektromos fókuszálással követjük az elúciós pool-ok méret- és töltés-eloszlását. A méret és töltés alapján végzett frakcionálás egyik példáját az alábbi, 2.4 példában mutatjuk be.

A szénhidr struktúra átrendezésének a második megközelítési módja magában foglalja a tisztított alfa-galaktozidáz A-n levő különböző glikoformák módosítását, további terminális cukor csoport hozzáadásával, tisztított glikozil-transzferáz és a megfelelő nukleotid-cukor donor használatával. Ez a kezelés csak azokat a glikoformákat érinti, amik megfelelő szabad terminális cukorcsoporttal rendelkeznek, amik akceptorként hatnak a használt glikozil-transzferáz számára. Például az $\alpha 2,6$ -szialil transzferáz szialsavat ad egy 2,6-kötéssel egy terminális $\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ -R akceptorhoz, nukleotid-cukor donorként CMP-szialsavat használva. A kereskedelmi forgalomban levő enzimek és forrásuk a következő: fukóz $\alpha 1,3$ transzferáz III, V és VI (ember); galaktóz $\alpha 1,3$ transzferáz (sertés); galaktóz $\beta 1,4$ transzferáz (szarvasmarha); mannóz $\alpha 1,2$ transzferáz (élesztő); szialsav $\alpha 2,3$ transzferáz (patkány) és szialsav $\alpha 2,6$ transzferáz (patkány). Miután a reakció teljesen lejátszódott, a glikozil-transzferáz eltávolítható a reakcióelegyből, egy olyan glikozil-transzferáz-specifikus affinitás oszlopot használva, ami a megfelelő nukleotidot egy 6 szénatomból álló karon keresztül egy pirofoszfáttal (GDP, UDP) vagy foszfáttal (CMP) köti a gélhez, vagy más, a szakterületen ismert kromatográfiás módszerrel. Az előzőekben felsorolt glikozil-transzferázok közül a szialil-transzferázok különösen jól használhatók az enzi-

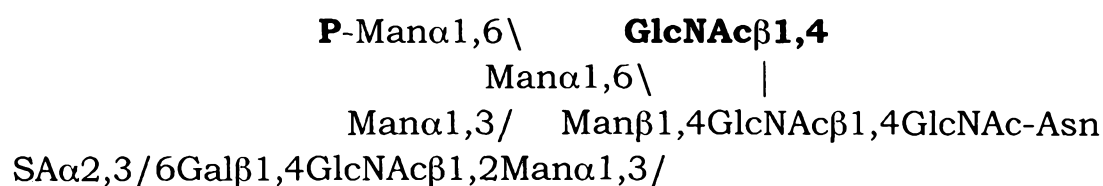
mek, azaz például az alfa-galaktozidáz A módosítására, aminek az a célja, hogy emberi betegek enzim-pótlásos kezelésében használják őket. Akármelyik szialil-transzferáznak CMP-5-fluoresceinil-neuraminsavval mint nukleotid cukor donorral való használata fluoreszcenciásan jelzett glikoproteint eredményez, aminek a felvétele és a szövetekben való lokalizálása könnyen követhető.

A szénhidrát struktúra átrendezésének harmadik megközelítési módja magában foglalja a gliko-génsebészetet, azaz például a sejt, azaz az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejt glikozilezési mechanizmusát befolyásoló gének bejuttatását, hogy módosítsuk a poszt-transzlációs processzálást a Golgi apparátusban. Ez egy előnyben részesített megvalósítási mód.

A szénhidrát struktúra átrendezésének negyedik megközelítési módja magában foglalja az alfa-galaktozidáz A kezelését megfelelő glikozidázokkal, hogy csökkentsük a jelenlevő különböző glikoformák számát. Ha például a komplex glikánláncokat egymás után neuraminidázzal, β -galaktozidázzal és β -hexózaminidázzal kezeljük, akkor ez az oligoszacharidot a trimannóz magig hasítja.

Az N-kapcsolt glikán struktúrája függ attól, hogy a fehérje térszerkezetének kialakulása után a Golgi processzási mannozidázok mennyire férnek hozzá a glikánlánchoz, és attól, hogy a Golgi apparátusban jelen van-e a glikozil-transzferázok családja és a megfelelő nukleotid-cukor donorok. Számos glikozil-transzferáz versengő reakciókat katalizál, amik azt

További GlcNAc T-III aktivitás jelenléte humán sejtekben növelheti a monofoszforilezett hibrid glikánok mennyiségét a bi-, tri- és tetra-elágazásos komplex glikánok rovására. Ennek nem szabad károsan befolyásolnia a plazma felezési időt, de növelheti a vaszkuláris endoteliális sejtekbe való irányítást. Az alábbiakban egy reprezentatív struktúrát mutatunk be:



Az alfa-galaktozidáz A-ból valamennyit felvesz a vese, és ez a tárolt glikolipidek szignifikáns növekedését eredményezi. Mivel a vese képes N-glikánokat képezni a kétágú GlcNAc csoportokkal, a vese epiteliális sejtjei az ezzel a speciális epitoppal rendelkező glikoproteineket nagy specifitással ismerik fel.

A megnövekedett GnT-III aktivitás képes a trimannozil mag elágazása egyensúlyának megbomlását okozni, azzal, hogy szubsztrát szinten gátolja a GnT-II, IV és V, valamint a Gal β 1,4-transzferázok révén történő további elágazást. Nemrég rekombináns GnT-III túlexpresszáltatásával egy olyan aranyhőrcsög petefészek (CHO) sejtvonalat hoztak létre, ami kétágú oligoszacharidokat vitt a glikoproteinekre [Sburlati és mtsai: Biotechnol. Progr. 14, 189-192 (1998)]. Az interferon bétát (IFN- β) választották modellnek és potenciális terápiás szekretált heterológ fehérjének, amin a GnT-III-expressziónak a termék glikozilezésére gyakorolt hatás ki lehet értékelni. A kétágú oligoszacharidokat

tartalmazó interferon-bétát termelik a génszabványi úton GnT-III expresszállóvá tett CHO sejtek, míg a módosíthatatlan sejtvonal nem termeli.

A glikoprotein terápiás szerek termeléséhez a glikozilezés jellemzésére van szükség, szarzsról-sarzsra való konzisztenciával. A „hipotetikus N-glikán töltés Z”-t egy paraméterként használtuk, hogy egyszerű, hatékony módon jellemezzük a fehérjék glikozilezését. A Z meghatározását többször megismételt kísérletben ellenőrizték, és nagyon pontosnak valamint megbízhatónak bizonyult [Hermentin és mtsai: *Glycobiology* 6, 217-230 (1996)]. Egy adott glikoprotein hipotetikus N-glikán töltését nagynyomású anioncserélő folyadékkromatográfia (HPAEC)/pulzáló amperometriás kimutatás (PAD) kombinációjával kapott N-glikán térképezési eredmények alapján számítjuk ki. A HPAEC-ben az N-glikánok a töltésük, azaz szialsav-csoportjaik száma alapján válnak szét, ezzel megkülönböztethető régiókat biztosítva a neutrális struktúráknak, azaz például a mono-, di-, tri- és tetraszialilezett N-glikánoknak. A Z definíció szerint a megfelelő területek termékeinek (A) az összege az aszialo-, monoszialo-, diszialo-, triszialo-, tetraszialo- és pentaszialo régióban, mindegyiket a megfelelő töltéssel szorozva:

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

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

ahol i értéke 0 az aszialo régióban, 1 a monoszialo (MS) régióban, 2 a diszialo (DiS) régióban, 3 a triszialo (TriS) régióban, 4 a tetraszialo (TetraS) régióban és 5 a pentaszialo (Penta) régióban.



Tehát a főleg C4-4* struktúrájú glikoprotein Z értéke ≈ 400 , egy főleg C2-* struktúrákat hordoz glikoprotein Z értéke ≈ 200 , és a magas mannóztartalmú, vagy csonkított struktúrákat hordozó glikoprotein Z értéke ≈ 0 .

A jelen találmány szerinti humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmények oligoszacharid töltése, a Z számmal mérve nagyobb mint 100, előnyösen nagyobb mint 150, és még előnyösebben nagyobb mint 170.

A szérum alfa-galaktozidáz A felezési idejének megváltoztatása foszforilezéssel

Az alfa-galaktozidáz A foszforilezése úgy változtatható meg, hogy befolyásolja az alfa-galaktozidáz A felezési idejét a keringésben és a sejtekbe belépő alfa-galaktozidáz A mennyiségét. A foszforilezést előnyösen az alfa-galaktozidáz A-t expresszáló sejtekben lehet elérni. Specifikus megfontolás tárgyát képezi egy olyan glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény előállítása, aminek megnőtt a foszforilezettsége, oly módon, hogy egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe foszforil-transzferázt kódoló DNS szekvenciát juttatunk be, vagy homológ rekombinációval egy endogén foszforil transzferáz gén expresszióját szabályozó szabályozó-szekvenciát juttatunk be. Az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet azután olyan körülmények között szaporítjuk, ami az alfa-galaktozidáz A és a foszforil-transzferáz expresszióját eredményezi. Azután a polinukleotidot nem tartalmazó sejtben termelt alfa-galaktozidáz A-hoz viszonyítva erősebben foszforilezett alfa-galak-



tozidáz A készítményt izoláljuk. Az ilyen foszforil-transzferázok jól ismertek a szakirodalomban, lásd például az 5,804,413 és 5,789,247 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk].

Két membránhoz kötött Golgi enzim összehangolt akciójára van szükség ahhoz, hogy egy lizoszómális proenzimen egy Man-6-foszfát felismerési markert generáljanak. Az első, az UDP-*N*-acetilglükózamin: glikoprotein *N*-acetilglükózamin-1-foszfotranszferáz (GlcNAc foszfotranszferáz) egy fehérje felismerési determinánst igényel a lizoszómális enzimeken, ami két, egymástól 35 Angström távolságban levő, a magas mannóztartalmú lánchoz viszonyítva helyes térállásban lizincsoportból áll. A második, az *N*-acetilglükózamin-1-foszfodiészter egy *N*-acetilglükózaminidáz (foszfodiészter α -GlcNAcáz) hidrolizálja az α -GlcNAc-foszfát kötést, ezzel hozzáférhetővé téve a Man-6-foszfát felismerési helyet.

A jelen találmány szerinti módszerek szerint a jelen találmány szerinti eljárásokkal előállított alfa-galaktozidáz A készítmények több glikoformát tartalmaznak, amiknek 16-50%-a, előnyösen 25-50%-a, még előnyösebben legalább 30%-a foszforilezve van.



A szérum alfa-galaktozidáz A felezési idejének megváltoztatása szialilezéssel

Az alulszialilezett glikánok szialilezettségének növelését terminális galaktóz csoportokkal úgy hajthatjuk végre, hogy emlős, előnyösen humán sejteket szialil-transzferáz génnel transzfektálunk.

A jelen találmány tárgyát megnőtt oligoszacharid töltéssel rendelkező glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény képezi, amit úgy állítunk elő, hogy először egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe bejuttatunk egy szialil-transzferázt kódoló polinukleotidot, vagy homológ rekombinációval bejuttatunk egy szabályozó-szekvenciát, ami egy endogén szialil-transzferáz gén expresszióját szabályozza. Az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet azután olyan tenyésztési körülmények között tenyésztjük, amik az alfa-galaktozidáz A és a szialil-transzferáz expresszióját eredményezi. A következő lépés a megnőtt oligoszacharid töltéssel rendelkező alfa-galaktozidáz A készítmény izolálása. Az előnyben részesített szialil-transzferázok közé tartozik egy $\alpha 2,3$ -szialil-transzferáz és egy $\alpha 2,6$ -szialil-transzferáz. Ezek jól ismert szialil-transzferázok, lásd például az 5,858,751 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírást, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk].

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint ez a szialilezést növelő eljárás magában foglal egy további lépést, amiben a megnőtt méretű vagy megnőtt töltésű alfa-galaktozidáz

A glikoformákat izoláljuk, a készítmény frakcionálásával vagy tisztításával (lásd az előzőket).

Egy másik változat szerint a jelen találmány úgy biztosítja a szialilezés növelését, hogy a sejteket alacsony ammónium-tartalmú környezetben tartjuk. Pontosabban, egy erősebben szialilezett glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítményt úgy állítunk elő, hogy egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet olyan tenyésztő közeggel hozzuk érintkezésbe, amiben az ammónium-koncentráció 10 mmol/l alatt, előnyösebben 2 mmol/l alatt van. A szialilezés növelését úgy érhetjük el, hogy a termelő sejteket perfundáltatjuk, aminek az az eredménye, hogy a toxikus metabolitokat, azaz például az ammóniát időről időre eltávolítjuk a tenyésztő közegből. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alacsony ammónium-tartalmú környezetet úgy érjük el, hogy glutamin-szintetáz gént vagy cDNS-t adunk a termelő sejtekhez. Egy másik változat szerint az alacsony ammónium-tartalmú környezetet úgy érjük el, hogy az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet friss tenyésztő közeggel perfundáltatjuk, hogy ezzel az ammónium-koncentrációt 10 mmol/l alatt, előnyösen 2 mmol/l alatt tartsuk. A termelő sejteket folyamatosan perfundáltatjuk friss tenyésztő közeggel, aminek az ammónium-koncentrációja 10 mmol/l alatt, előnyösen 2 mmol/l alatt van. Egy másik változat szerint a termelő sejteket időközönként perfundáltathatjuk friss tenyésztő közeggel. Az időközönként végzett perfúzió szakkifejezés, ahogy azt a továbbiakban használjuk, a szabályos időközönként, periódikusan végzett perfúziót

jelenti, vagy azt, hogy jelenti, hogy mérjük az ammónium-koncentrációt, és akkor végezzük el a perfúziót, amikor az eléri a megcélzott koncentrációt (azaz az 10 mmol/l-t, előnyösebben a 2 mmol/l-t). Az időközönként végzett perfúziót olyan gyakorisággal kell végrehajtani, hogy az ammónium-koncentráció soha ne haladja meg a megcélzott koncentrációt. A termelő sejteket olyan időközönként perfundáltatjuk, ami ahhoz szükséges, hogy olyan alfa-galaktozidáz A készítményt kapjunk, amiben a glikánok 50-70%-ban, előnyösen 60%-ban szialilezve vannak.

A szérum alfa-galaktozidáz A keringési felezési idejének növelése az alfa-galaktozidáz A pegilezésével

Szintén a jelen találmány szerint egy humán glikozilezett alfa-galaktozidáz A készítmény felezési idejét a keringésben úgy növelhetjük, ha az alfa-galaktozidáz A-t polietilénglikollal komplexbe vesszük. A polietilénglikol (PEG) egy vízzoldható polimer, ami kovalens kötéssel a fehérjéhez kötve megváltoztatja tulajdonságait, oly módon, hogy megnöveli potenciális felhasználhatóságukat. A polietilénglikollal végzett módosítás („pegilezés”) egy jól kidolgozott technika, aminek megvan a kapacitása, hogy a fehérje- és peptid-gyógyszer-készítmények számos problémáját megoldja vagy enyhítse.

A pegilezett fehérjéknek a módosítatlan fehérjékkel összehasonlítva javított gyógyászati teljesítőképessége ösztönzi az ilyen típusú konjugátumnak terápiás ágensként való kifejlesztését. Azok az enzim-deficienciák, amikre a természetes enzimmel

végzett terápi hatástalan volt (a gyors kiürülés és/vagy immunológiai reakciók miatt), most már kezelhetők az ekvivalens PEG-enzimokkal. Például a PEG-adenozin-dezamináz már megkapta az FDA jóváhagyást [Delgado és mtsai: Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 9, 249-304 (1992)].

A PEG-nek a zöldkávéból származó alfa-galaktozidázhoz kovalens kötéssel való hozzákapcsolása molekulán levő specifikus determináns helyek maszkolásával megváltoztatja az enzim katalitikus tulajdonságait. Ennek eredménye a K_m értékének növekedése és a V_{max} értékének csökkenése a p-nitrofenil szubszt-rát analógokkal szemben [Wieder & Davis: J. Appl. Biochem. 5, 337-347 (1983)]. Az alfa-galaktozidáz még képes lehasítani a terminális galaktóz csoportokat a humán nyál vércsoport B anyagáról. Az ellenanyag- és lektin-specifikus kötődés elvész a PEG-alfa-galaktozidázból. A természetes alfa-galaktozidáz ellen készített ellenanyagok képesek blokkolni az enzimaktivitást, és ez a gátlás fokozatosan elvész, ha progresszíve növekvő mennyiségű PEG-et tartalmazó készítményekkel szemben teszteljük. Ezzel szemben a PEG-alfa-galaktozidázzal immunizált állatokból származó antiszérumok egyik alfa-galaktozidáz vagy PEG-alfa-galaktozidáz készítményben sem gátolják az enzim aktivitását. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PEG hajlamos a lektin-specifikus szénhidr egységek és antigén determinánsok lefedésére, és ezek a helyek valószínűleg kriptikusak maradnak a PEG-enzimek *in vivo* processzálása során.

A PEG kovalens kötéssel fehérjékhez való kapcsolása megkívánja a polimer terminális hidroxil-csoportjának egy megfelelő lehasadó csoporttal való aktiválását, ami a lizin ϵ -amino terminálisának és az N-terminális α -amino csoportjának a nukleofil támadásával helyettesíthető. Hét kémiai csoportot alkalmaznak a PEG aktiválására. Az egyes alkalmazásokban a különböző kapcsolási módszerek különböző előnyöket biztosítanak. A pegilezés különböző módszerei meglepő és drasztikus hatással vannak az olyan faktorokra, mint például a kapott pegilezett fehérjék és peptidek biológiai aktivitása megmaradására, stabilitására és immunogenitására [Francis és mtsai: Int. J. Hematol. 68(1), 1-18 (1998)]. Egy linker nélküli pegilezési technika például csak a PEG-et kapcsolja a megcélzott molekulához. Pontosabban, egy biológiailag optimalizált pegilezési technika alkalmazása, amiben trezil-monometoxi PEG-et (TMPEG) használunk, Francis és munkatársai szerint számos különböző fehérje esetében felfedi, hogy kivételesen képes konzerválni a célpont biológiai aktivitását [Francis és mtsai: Int. J. Hematol. 68(1), 1-18 (1998)]. Ez, valamint az a jótékony hatás, hogy polietilén-glikolon kívül (amiről bebizonyosodott, hogy a humán terápiában biztonságosan használható) mást nem viszünk a fehérjébe, ideálissá teszi az alfa-galaktozidáz A módosítására.

A polietilén-glikolnak a fehérjékhez való kapcsolására négy lehetséges hely van: 1) aminocsoportok (N-terminális és lizin); 2) karboxics csoportok (aszparaginsav és glutaminsav); 3) szulfhidril csoportok (cisztein); és 4) szénhidrát csoport (perjodát kezelés

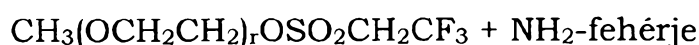
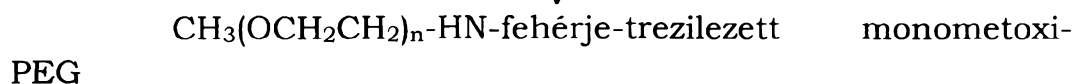
után kapott szulfhidril csoportok). A fehérjék karboxicsoportjához és a szénhidrátokon levő aldehid-csoportokhoz való kapcsoláshoz egy nukleofil aminocsoporttal rendelkező polietilénglikol reagensre van szükség. Ez a kémia megváltoztatja az alfa-galaktozidáz A pI értékét, miután a negatív töltésű karboxicsoportot megköti a polietilénglikol. A pI bármilyen változása befolyásolhatja az alfa-galaktozidáz A biológiai aktivitását. Emellett, a polietilénglikolnak a szénhidrát lánchoz való kapcsolása befolyásolhatja az alfa-galaktozidáz A-nak az M6P receptor által való megkötését, ami kritikus a biológiai aktivitás szempontjából. A szulfhidril kémia érinti a molekula fizikai szerkezetét is, és ez nem javasolt.

A pegilezés általánosan használt módszerei amidkötést hoznak létre a fehérje aminocsoportja és a monometoxi-PEG metoxicsoportja között. Az NHS-PEG kereskedelmi forgalomban van, és amidkötést eredményez a fehérje és a polietilénglikol között. Azonban az amidkötés kialakulása megváltoztatja a pI értéket, mivel elvész a $-NH_2$ csoport pozitív töltése.

A polietilénglikol alfa-galaktozidáz A-hoz való kapcsolásának az a módszere, amiben nem változik a pI érték, trezil-PEG-et használ. A trezil-PEG az aminocsoporton keresztül végzi a kapcsolást, és stabil szekunder amint képez. A szekunder aminnal az az előnye, hogy megtartja az aminocsoport pozitív töltését. A trezil-PEG kereskedelmi forgalomban van, és stabil liofilezett és kiszáritott formában. A trezil-PEG-et alaposan jellemezték, és a melléktermékek is jól ismertek. Ennek megfelelően, egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az alfa-ga-

laktozidáz A készítményt komplexbe visszük trezil-monometoxi polietilénglikollal (TMPEG), így pegilezett-alfa-galaktozidáz A-t képezve. A pegilezett-alfa-galaktozidáz A-t azután tisztítjuk, így kapunk izolált, tisztított pegilezett-alfa-galaktozidáz A-t.

REAKCIÓSÉMA



Az alfa-galaktozidáz A tartalmaz 18 aminocsoportot, 17 ϵ -aminocsoportot (lizin) és egy α -aminocsoportot (N-terminális). A reakció úgy szabályozható, hogy minimális helyettesítésekkel termeljük az alfa-galaktozidáz A-t, és a molekulákat, amikben molekulánként csak egy, vagy kevesebb PEG egység van, megtisztíthatjuk a helyettesítetlen és többszörösen helyettesített formáktól. Az alfa-galaktozidáz A többszörös helyettesítése nem befolyásolhatja szignifikánsan a biológiai aktivitást; ennek következtében a végtermék 1-18 kapcsolódó polietilénglikol molekulát tartalmazó heterogén elegyet eredményezhet. A helyettesítés szintje függ a visszatartott enzimaktivitás szintjétől. Meg kell jegyeznünk, hogy az enzimaktivitás csökkenése eltolható egy fokozott terápiás hatással, ami az alfa-galaktozidáz A keringési felezési idejének növeléséből és immun-felismerésének csökkenéséből származik. tehát a PEG-alfa-galaktozidáz A termék kifejlesztésében a polietilénglikolnak az alfa-galaktozidáz A-hoz

viszonyított aránya a biológiai aktivitástól függhet, és nem kizárólag az enzimaktivitástól.

A pegilezési reakcióhoz szabályozott pH-ra, pufferösszetételre és fehérje-koncentrációra van szükség. A helyes reakciókörülményeket ultraszűrőssel/diaszűrőssel lehet elérni, amit jelenleg is használnak a gyártási eljárásban. Közvetlenül a reakció előtt a trezil-PEG-et gyorsan szolubilizáljuk vízben, folyamatos kevertetés közben. Azután ezt az oldatot hozzáadjuk az elkészített alfa-galaktozidáz A-hoz, és hagyjuk hogy szabályozott ideig és szabályozott hőmérsékleten reagáljon (azaz például 2 óra hosszat 250 °C-on). A pegilezés a végső tisztítási lépés előtt hajtható végre, ami eliminálja a tisztítási eljáráshoz hozzáadott lépéseket. Miután a kapcsolás teljes, a PEG-alfa-galaktozidáz A-t a többi tisztítási lépésben processzáljuk. A Q oszloposítás (anioncserélés) előtt végrehajtva a reakciót lehetővé válik, hogy két tisztítási lépésben eltávolítsuk a melléktermékeket. Mivel a polietilén-glikol nem tartalmaz semmilyen negatív töltést, ezért ezt nem tartja vissz a Q Sepharose, és az átfolyóval kiürül.

A pegilezés mértékét ismert technikákkal lehet mérni. Például a fluoreszkamin fluoreszkál, ha a fehérjék α -amino és ϵ -amino csoportjaihoz kötődik. A fluoreszcencia elvesztésének százaléka a pegilezés után korrelál az alfa-galaktozidáz A-hoz kötött polietilén-glikol százalékaival. A fehérje-koncentráció meghatározására a Pierce BCA esszét lehet használni. A metilumbiferil- α -D-galaktopiranozid (4-MUF- α -Gal) aktivitás esszét használjuk a PEG-alfa-galaktozidáz A enzimaktivitás hatásának kiértékelésére. Az alfa-galaktozidáz A tartalmaz M6P-t, ami a lizoszómákba való



bejutáshoz szükséges. Azt, hogy a polietilénglikol mennyire zavarja az M6P receptor felismerést, egy sejt-alapú esszével értékelhetjük ki, ami követi a polietilénglikol-alfa-galaktozidáz A bejutását a lizoszómákba.

Az alfa-galaktozidáz A készítmény beadási módszerei

A jelen találmány szerinti készítmények (azaz azok, amik különböző alfa-galaktozidáz A glikoformákat tartalmaznak) bármilyen módon beadhatók, ami kompatibilis az alfa-galaktozidáz A készítménnyel. A tisztított alfa-galaktozidáz A készítmény azoknak az egyedeknek adható be, akik vagy hibás, vagy nem elegendő mennyiségű alfa-galaktozidáz A fehérjét termelnek, vagy akiknek az alfa-galaktozidáz A terápia jótékony hatású lehet. A jelen találmány szerinti terápiás készítményeket bármilyen megfelelő módon beadhatjuk, azaz közvetlenül (úgy mint lokálisan, injekcióval, beültetve vagy egy szöveti pontba való topikális beadással) vagy szisztémásan (azaz orálisan vagy parenterálisan).

A beadás útja lehet orális vagy parenterális, beleértve az intravénás, szubkután, intra-arteriális, intraperitoneális, szembe történő, intramuszkuláris, szájüregbe történő, rektális, vaginális, intraorbitális, intracerebrális, intradermális, a koponya belsejébe történő, intraspinális, intraventrikuláris, intratekális, intraciszternális, intrakapszuláris, intrapulmonáris, intranazális, transzmukozális, transzdermális beadási módot, vagy a belégzést. Az intrapulmonáris beadási módokat, berendezést és gyógyszerkészítményt például az 5,785,048, 5,780,019 és 5,775,320 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Az intradermális bejuttatás egy előnyben részesített módszere az

iontoforetikus bejuttatás tapasztalás segítségével; egy ilyen bejuttatási módot az 5,843,015 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetnek, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A beadás egy különösen előnyös módja a szubkután injekciózás. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítményt úgy szereljük ki, hogy a teljes szükséges dózist beadhatjuk egyetlen, egy-két milliliteres injekcióban. Ahhoz, hogy az injekció térfogata egy-két milliliter lehessen, a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítményt olyan koncentrációban szereljük ki, hogy az előnyben részesített dózist egy-két milliliter térfogatban lehessen beadni, vagy az alfa-galaktozidáz A készítményt kisserelhetjük liofilezett formában, amiből beadás előtt vízben vagy megfelelő, fiziológiásan kompatibilis pufferben elkészítjük a megfelelő oldatot. Az alfa-galaktozidáz A készítmények szubkután injekcióinak az az előnyük, hogy a betegek számára kényelmesek, főleg amikor önmaguknak adják be az injekciót, emellett pedig az intravénás beadáshoz viszonyítva hosszabb plazma felezési időt eredményeznek. A plazma felezési idő meghosszabbítása azzal az eredménnyel jár, hogy az alfa-galaktozidáz A hatékony plazmaszintje hosszabb ideig megmarad, aminek az a jótékony hatása, hogy a klinikaiéag érintett szövetek hosszabb ideig érintkeznek az injekciózott alfa-galaktozidáz A-val, és ennek eredményeképpen több alfa-galaktozidáz A jut be az ilyen szövetekbe. Emiatt jobb a betegekre gyakorly hatása, és/vagy csökken a beadás gyakorisága. Emellett a betegek kényelmének növeléséhez készített különböző eszközök, azaz például az újratölthető injekciós tollak és tű nélküli injekciós

eszközök használhatók a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítményekkel, amint azt az alábbiakban tárgyaljuk.

A beadás módja lehet a készítmény bolus periodikus injekciózása, vagy beadhatjuk a készítményt intravénásan vagy intraperitoneálisan egy tartalékból, ami lehet külső (azaz egy intravénás zacskó) vagy belső (azaz egy biológiailag lebomló implantátum, egy mesterséges biológiai szerv, vagy beültetett alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtek populációja) (4,407,957 és 5,798,113 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk). Az intrapulmonáris beadási módokat és berendezéseket például az 5,645,007, 5,780,014 és 5,814,607 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetik, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Más használható parenterális bejuttató eszköz például az etilén-vinilacetát kopolimer részecskék, az ozmotikus pumpák, a beültethető infúziós rendszerek, a pumpás bejuttatás, a kapszulázott sejtek bejuttatása, a liposzómális bejuttatás, a tűvel bejuttatott injekciók, a tű nélkül bejuttatott injekció, a nebulizátor, az aeroszolizátor, az elektroporáció és a transzdermális tapasz. A tű nélküli injekciós eszközöket az 5,879,327, 5,520,639; 5,846,233 és 5,704,911 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásokban ismertetik, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. Bármelyik előzőekben ismertetett alfa-galaktozidáz A készítmény beadható ezekkel a módszerekkel.

A beadás módja, és a bejuttatott fehérje mennyiségét olyan módszerekkel határozhatjuk meg, amik a szakterületen jártas szakember kötelező ismeretei közé tartoznak. Emellett, a szakterületen jártas szakember tudatában van annak, hogy egy terá-

piás fehérje beadási módja és dózisa addig változtatható, ameddig megkapjuk a terápiás dózist.

Az alfa-galaktozidáz A fehérje gyógyászati készítményei

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá egy alfa-galaktozidáz A készítmény új kiszerelési formái, amik lényegében mentesek a nem-alfa-galaktozidáz A fehérjéktől, azaz például az albumintól, a gazdasejt által termelt nem-alfa-galaktozidáz A fehérjéktől, vagy egy állati szövetből vagy folyadékból izolált fehérjéktől.

A készítmény előnyösen tartalmazza egy vizes vagy fiziológiásan elfogadható folyékony szuszpenzió vagy oldat egy részét. A hordozó vagy töltőanyag oly módon kompatibilis, hogy amellet, hogy a kívánt készítményt bejuttatja a betegbe, nem érinti károsan a beteg elektrolit rendszerét és/vagy térfogat-egyensúlyát. A parenterális beadás használható oldatait a gyógyszerészeti szakmában ismert bármelyik jól ismert módszerrel előállíthatjuk [Remington's Pharmaceutical Sciences, szerk.: Gennar, A., Mack Pub. (1990)]. Nem-parenterális készítmények is használhatók, azaz például kúpok vagy orális készítmények.

A készítmény előnyösen tartalmaz egy töltőanyagot. Az alfa-galaktozidáz A-hoz használható, gyógyászatilag elfogadható töltőanyagok, amiket betehetünk a készítménybe, lehetnek pufferek, azaz például citrát-puffer, foszfát-puffer, acetát-puffer és bikarbonát-puffer, aminosavak, karbamid, alkoholok, aszkorbinsav, foszfolipidek; fehérjék, azaz például szérum-albumin, kollagén és zselatin; sók, azaz például EDTA és EGTA, valamint nátrium-klorid; liposzómák; polivinil-pirrolidon; cukrok, azaz például dextrán, mannit, szorbit és glicerin; glicin vagy más

aminosavak és lipidek. Az alfa-galaktozidáz A készítményekben használható puffer-rendszerek közé tartoznak az acetát, a bikarbonát és a foszfát pufferek (mindegyik beszerezhető a SIGMA-tól). Az előnyben részesített megvalósítási módban foszfát puffert használunk. Az alfa-galaktozidáz A készítmények előnyben részesített pH-tartománya 4,5-7,4.

A készítmény emellett előnyösen tartalmaz még egy nem-ionos detergenst. Az előnyben részesített nem-ionos detergensek közé tartozik a Polysorbate 20, a Polysorbate 80, a Triton X-100, a Triton X-114, a Nonidet P-40, az oktil- α -glükózid, az oktil- β -glükózid, a Brij 35, a pluronic és a Tween 20 (mindegyik beszerezhető a SIGMA-tól).

Egy különösen előnyben részesített készítmény Polysorbate 20 vagy Polysorbate 80 nem-ionos detergenst és foszfáttal pufferezelt sóoldatot tartalmaz, legelőnyösebben pH=6 értéken.

Az alfa-galaktozidáz A készítmények liofilezéséhez a fehérjekoncentráció 0,1-10 mg/ml lehet. Térkitöltő ágenssek, azaz például glicin, mannit, albumin és dextrán adhatók a liofilező elegyhez. Emellett a feltehetően krioprotektáns tulajdonságokkal rendelkező anyagok, azaz például diszacharidok, aminosavak és polietilén-glikol adhatók a liofilező elegyhez. Bármelyik előzőekben felsorolt puffer, töltőanyag és detergens hozzáadható az elegyhez.

Az injekciózáshoz készített alfa-galaktozidáz A egy előnyben részesített kiszerelési formájában a fehérjekoncentráció 1 mg/ml.

A beadáshoz való kiszerelési formák tartalmazhatnak glicerint és más, magas viszkozitású komponenseket, amik segítenek abban, hogy az ágens a kívánt lókuszban maradjon. A

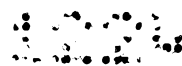
biokompatibilis polimerek, előnyösen a biológiailag felszívódó, biológiailag kompatibilis polimerek (beleértve például a hialuronsavat, a kollagént, a polibutirát, a laktid és a glikolid polimereket, valamint a laktid/glikolid kopolimereket), jól használható töltőanyagok az ágensek *in vivo* felszabadulásának szabályozásában. A parenterális beadáshoz szánt készírelési formák közé tartozik a glikokolát a szájüregen keresztül való beadáshoz, a metoxiszalicilát a rektális beadáshoz vagy citromsav a vaginális beadáshoz. A rektális beadáshoz használt kúpokat úgy állíthatjuk elő, hogy a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítményt összekeverjük egy nem-irritáló töltőanyaggal, azaz például kakaóvajjal, vagy más olyan anyaggal, ami szobahőmérsékleten szilárd, testhőmérsékleten pedig folyékony.

Az inhalációs beadáshoz szánt készítmények tartalmazhatnak laktózt vagy más töltőanyagokat, vagy lehetnek vizes oldatok, amik tartalmazhatnak polioxietilén-9-lauril étert, glikokolátot vagy dezoxikolátot. Egy előnyben részesített belégzési aeroszolt az jellemez, hogy részecskéinek kisebb a sűrűsége és nagyobb a mérete. A 0,4 gramm per köbcentiméternél kisebb sűrűségű részecskék, amiknek az átlagos átmérője meghaladja az 5 μm -t, hatékonyan bejuttatják a szisztémás keringésbe a terápiás hatóanyagokat. Az ilyen részecskék mélyen bejutnak a tüdőbe, és elkerülik a tüdő természetes kiürítő mechanizmusait, ameddig a belégzett részecskék leadják a szállított anyagot [Edwards és mtsai: Science 276, 1868-1872 (1997)]. A jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A készítmények beadhatók aeroszolizált formában, például az 5,654,007, 5,780,014 és 5,814,607 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetett módszerek, készítménnyel és készírelési formák használatával,

amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. Az intranazális beadáshoz szánt készítmények tartalmazhatnak olajos oldatokat az orrcseppek formájában való beadáshoz, vagy lehetnek gélek, az intranazális beadáshoz.

A bőr felszínére történő topikális beadáshoz készített készítményeket úgy állíthatjuk elő, hogy az alfa-galaktozidáz A készítményt egy dermatológiailag elfogadható hordozóval, azaz borogatóvízzel, krémmel, kenőccsel vagy szappannal diszpergáljuk. Különösen azok a hordozók hasznosak, amik filmet vagy réteget képeznek a bőrön, hogy lokalizálják az alkalmazott anyagot, és meggátolják az eltávolítást. Ahhoz, hogy a belső szövetfelszínekre topikálisan tudjuk alkalmazni, az alfa-galaktozidáz A készítményt folyékony szövetragasztóban vagy más olyan anyagban diszpergálhatjuk, amiről ismert, hogy fokozza a szövet felszínéhez való adszorpciót. Például számos nyálkahártya ragasztóanyagot és szájjüreg tablettát írtak le a transzmukozális gyógyszer-beadáshoz, lásd például a 4,740,365, 4,764,378 és 5,780,045 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. Hidroxipropilcellulóz vagy fibrinogén/trombin oldatok is használhatók. Egy másik változat szerint szövet-beborító oldatok, azaz például pektint tartalmazó készítmények is használhatók.

A jelen találmány szerinti készítményeket beadhatjuk konténerekben, amik alkalmasak a sterilitás fenntartására, az aktív adalékanyag aktivitásának megvédésére a megfelelő eloszlás és tárolás során, és biztosítják, hogy a készítményt egyszerűen és hatékonyan be lehessen adni a betegnek. Az alfa-galaktozidáz A készítmény egy injekciózható kiserelési formáját beadhatjuk lezárt ampullában, aminek a tartalma túvel és



fecskendővel eltávolítható. Az ampullát száánhatjuk egyszeri vagy többszöri felhasználásra. A készítményt kiszerezhetjük előre betöltött fecskendőben. Néhány esetben a tartalmát biztosíthatjuk folyékony formában, míg más esetekben biztosíthatjuk száraz vagy liofilezett állapotban, ami néhány esetben megköveteli, hogy egy standard, vagy külön biztosított oldószerrel helyreállítsuk a folyékony állapotot. Ha a készítményt folyékony formában biztosítjuk az intravénás beadáshoz, akkor ehhez használhatunk steril zacskót vagy konténert, ami alkalmas arra, hogy egy intravénás beadási vonalhoz vagy katéterhez kapcsoljuk. Az előnyben részesített megvalósítási módok szerint a jelen találmány szerinti készítményeket folyékony vagy porított formában biztosítjuk, olyan berendezésekben, amik kényelmesen bejuttatnak egy előre meghatározott dózist a készítményből; ilyen berendezés lehet például egy tű nélküli injektor szubkután vagy intramuszkuláris injekciózáshoz, és egy mért dózisú bejuttató berendezés. Más esetekben a készítményt olyan formában biztosíthatjuk, ami alkalmas az ellenőrzött leadásra, azaz például egy tapaszban vagy kötszerben, amit a bőrre kell tenni a transzdermális beadáshoz, vagy lebomló eszközök formájában a transzmukozális beadáshoz. Azokban az esetekben, amikor a készítményt tableta vagy pirula formájában orálisan adjuk be, a készítményt kiszerezhetjük egy eltávolítható tetejű palackban. A konténereket a megfelelő információkkal láthatjuk el, azaz például, hogy mi a készítmény formája, a gyártó vagy a disztribútor neve, az indikáció, a javasolt dózis, a javasolt tárolási körülmények, vagy javaslatok a beadáshoz.



Dózisok az alfa-galaktozidáz A készítmény beadásához

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a Fabry-betegségben szenvedő betegeknek, a Fabry-betegség atipikus formáiban, vagy olyan kórban szenvedő betegeknek, akikben az alfa-galaktozidáz A-nak csökkent szintje vagy mutáns formája van jelen, beadott alfa-galaktozidáz A készítmény beadási módszerei. A beadott dózis előnyösen 0,05-5,0 mg, még előnyösebben 0,1-0,3 mg alfa-galaktozidáz A készítmény per testsúlykg, és ezt hetente vagy kéthetente adjuk be. A fehérjét szabályos időközönként ismételt dózisait a betegnek egész életében kapnia kell. Szubkután injekciókat használhatunk hogy hosszabb ideig fenntartsuk a gyógyszerrel való szisztémás érintkezést. A szubkután dózis 0,01-10,0 mg, előnyösen 0,1-5,0 mg alfa-galaktozidáz A készítmény per testsúlykg, hetente vagy kéthetente. Az intramuszkuláris injekciókkal beadott alfa-galaktozidáz A készítmény dózisa lehetnek azonosak, vagy lehetnek a szubkután dózistól eltérőek; egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint az intramuszkuláris dózisok kisebbek mint a szubkután injekciózott dózisok, és ritkábban adjuk be azokat. Az alfa-galaktozidáz A készítményt beadhatjuk intravénásan, azaz például intravénás bolus injekcióval, egy lassan nyomott intravénás injekcióval, vagy folyamatos intravénás injekcióval. A folyamatos (azaz például 2-6 óra hosszan tartó) intravénás infúzió lehetővé teszi, hogy specifikus szinteket tartsunk fenn a vérben.

Egy alternatív, előnyben részesített megvalósítási mód az alfa-galaktozidáz A készítmény egy betegnek való beadásához abból áll, hogy az alfa-galaktozidáz A készítményből több évig,



akár három évig, hetente vagy kéthetente beadunk egy előnyben részesített dózist, amely idő alatt a beteget klinikailag ellenőrizzük, és kiértékeljük betegségének állapotát. A például a vese vagy szív-funkciók, vagy a beteg általános állapotának (azaz például fájdalom) javulása alapján mért klinikai javulások, valamint a laboratóriumi értékek javulása, azaz például a CTH szintek csökkenése a vizeletben, a plazmában vagy a szövetekben, használható a beteg egészségi állapotának becslésére. Abban az esetben, ha klinikai javulás figyelhető meg a kezelés után és az ellenőrzési periódusban, akkor az alfa-galaktozidáz A beadás gyakoriságát csökkenthetjük. Például ha egy beteg hetente kap injekciókat egy alfa-galaktozidáz A készítményből, akkor ezt kétheti injekciózásra változtathatjuk. Egy másik változat szerint, ha egy beteg kéthetente kap injekciókat, akkor ezt havi egyszeri injekciózásra változtathatjuk. A beadás gyakoriságának ilyen megváltoztatása után a beteget újra évekig, azaz például három évig megfigyelés alatt kell tartani, hogy megbecsüljük a Fabry-betegséghez kapcsolódó klinikai és laboratóriumi értékeket. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a beadott dózis nagysága nem változik meg, ha megváltoztatjuk a dózis beadásának gyakoriságát. Ez biztosítja, hogy bizonyos farmakokinetikai paraméterek (azaz például a maximális plazma koncentráció $[C_{\max}]$, a maximális plazma koncentráció eléréséhez szükséges idő $[t_{\max}]$, a plazma felezési idő $[t_{1/2}]$, és az érintkezés, amit a görbe alatti terület $[AUC]$ alapján mérünk, viszonylag állandó marad minden egyes beadott dózis után. Ezeknek a farmakoki-



netikai paramétereknek a fennmaradása viszonylag állandó szinteket eredményez az alfa-galaktozidáz A-nak a receptor által a szövetekbe közvetített felvételében, ahogy a dózis gyakorisága változik.

A Fabry-betegség egy atípusos variánsában szenvedő beteg, azaz aki főleg kardiovaszkuláris abnormalitásokban, vagy vese-problémákban szenved, ugyanezekkel a dózistartományokkal kezeljük, azaz körülbelül 0,05 - 5 mg/kg hetente vagy kéthetente. A dózist az igényeknek megfelelően állítjuk be. Például annak a betegnek az esetében, aki szív-variáns fenotípusban szenved, és alfa-galaktozidáz A enzim-pótlási terápiával kezelnek, a terápiát követően megváltozik a szív összetétele és javulnak a keringési funkciói. Ezt a változást standard echokardiográfiai módszerekkel mérhetjük, amivel ki lehet mutatni a bal ventrikuláris fal megvastagodását a Fabry-betegségben szenvedő betegeknél [Goldman és mtsai: J. Am. Coll. Cardiol. 7, 1157-1161 (1986)]. A bal ventrikuláris fal vastagságát sorozatosan mérhetjük echokardiográfiával, és a ventrikuláris falvastagság csökkenése a terápiás választ jelzi. Az alfa-galaktozidáz A enzim-pótlás terápiát kapott betegeket követhetjük szív mágneses rezonancia rezonancia leképezéssel (MRI). Az MRI-nek megvan az a képessége, hogy meg lehet vele becsülni egy adott szövet relatív összetételét. Például a szív MRI Fabry-betegségben szenvedő betegeknél kimutatja a lerakódott lipidet a szívizomban, a kontroll betegekhez viszonyítva [Matsui és mtsai: Am. Heart J. 117, 472-474 (1989)]. Egy enzim-pótlással kezelt beteg sorozatos MRI



mérésével ki lehet mutatni a lipid lerakódás változását egy beteg szívében. A vese variáns fenotípusban szenvedő betegek számára is előnyös az alfa-galaktozidáz A enzimpótlás terápia. A terápia hatása a vesefunkció standard mérésével követhető, azaz a 24-órás vizelet fehérjeszint, a kreatinin kiürülés és a glomeruláris szűrés sebessége alapján. Az alábbi példákat azzal a céllal adjuk meg, hogy még jobban illusztráljuk a jelen találmány előnyben részesített megvalósítási módjait. Ezek a példák semmiképpen nem korlátozzák a jelen találmánynak a csatolt igénypontok által definiált oltalmi körét.

1. Példa

Az alfa-galaktozidáz A bejuttatására és expresszáására tervezett konstrukciók készítése és használata

Két expressziós plazmidot készítettünk, a pXAG-16-ot és a pXAG-28-at. Ezek a plazmidok tartalmazzák humán alfa-galaktozidáz A cDNS-t, ami az alfa-galaktozidáz A enzim 389 aminosavját kódolja (az alfa-galaktozidáz A szignálpeptid nélkül); a humán növekedési hormon (hGH) szignálpeptid genomiális DNS szekvenciáját, amit a humán növekedési hormon gén első intronja szakít meg; és a humán növekedési hormon gén 3' nem-transzlálódó szekvenciáját (UTS), ami tartalmaz poliadenilezési szignált. A pXAG-16 tartalmazza a humán citomegalovírus közvetlen korai (CMV IE) promotert és az első intront (amit nem-kódoló exon szekvenciák határolnak), míg a pXAG-28-at a kollagén $\alpha 2$ promoter és 1-es exon hajtja meg, valamint tartalmazza

a β -aktin gén 5' UTS-t, ami tartalmazza a β -aktin gén első intronját.

1.1 A komplett alfa-galaktozidáz A cDNS klónozása, és a pXAG-16 alfa-galaktozidáz A expressziós plazmid készítése

A humán alfa-galaktozidáz A cDNS-t humán fibroblaszt cDNS könyvtárból klónoztuk, amit az alábbiak szerint állítottunk elő. A poli-A⁺ mRNS-t össz-RNS-ből izoláljuk, majd a cDNS szintézisét a lambda ZapII rendszerrel hajtjuk végre, a gyártó utasításai szerint (Stratagene, LaJolla, CA). Röviden, az „első szál” cDNS-t reverz transzkripcióval állítjuk elő, oligo-dT primer jelenlétében, ami egy belső XhoI restrikciós hasítási helyet tartalmaz. RNáz H-val való kezelés után a cDNS nick-transzlációba visszük, kétszálú cDNS előállítása céljából. Ezt a cDNS-t T4 DNS polimerázzal tompavégűvé tesszük, majd EcoRI adaptorokhoz ligáljuk. Ennek a ligálásnak a termékeit T4 DNS kinázzal kezeljük, majd XhoI restrikciós enzimmal emésztjük. A cDNS-t Sephacryl-400 kromatográfiával frakcionáljuk. A nagy és közepes méretű frakciókat egyesítjük, és a cDNS-t EcoRI és XhoI restrikciós enzimekkel emésztett Lambda ZapII karokhoz ligáljuk. Ennek a ligálásnak a termékeit azután pakoljuk és titerét meghatározzuk. A primer kar titere $1,2 \times 10^7$ pfu/ml, az átlagos inszert mérete 925 bázispár.

A humán alfa-galaktozidáz A gén (1. ábra, 1. számú szekvenciavázlat) 7-es exonjának egy 210 bázispár méretű próbáját használjuk a cDNS izolálására. A próbát magát genomiális DNS-

ből izoláltuk polimeráz láncreakcióval, az alábbi oligonukleotidok alkalmazásával:

5'-CTGGGCTGTAGCTATGATAAAC-3' (1-es oligonukleotid, 6. számú szekvencia) és

5'-TCTAGCTGAAGCAAAACAGTG-3' (2-es oligonukleotid, 7. számú szekvencia).

A polimeráz láncreakció termékét használjuk azután a fibroblaszt cDNS könyvtár átvizsgálására, a pozitív klónokat izoláljuk és tovább jellemezzük. Az egyik pozitív klónt, a 3A fágot a lambda ZapII rendszer excíziós protokollnak vetettük alá (Stratagene, Inc., LaJolla, CA), a gyártó utasításai szerint. Ezzel az eljárással kaptuk a pBSAG3A plazmidot, ami az alfa-galaktozidáz A cDNS szekvenciát tartalmazza a pBluescriptSK™ plazmid gerincben. A DNS szekvenálás kiderítette, hogy ez a plazmid nem tartalmazza a cDNS szekvencia teljes 5' végét. Ezért az 5' véget a humán genomiális DNS-ből amplifikált polimeráz láncreakció fragmenssel állítottuk helyre. Ennek végrehajtásához egy 268 bázispár méretű genomiális DNS fragmenst (2. ábra, 2. számú szekvenciavázlat) amplifikáljuk, az alábbi oligonukleotidok használatával:

5'-ATTGGTCCGCCCCTGAGGT-3' (3-as oligonukleotid, 8. számú szekvenciavázlat) és

5'-TGATGCAGGAATCTGGCTCT-3' (4-es oligonukleotid, 9. számú szekvenciavázlat).

Ezt a fragmenst szubklónozzuk egy „TA” klónozó plazmidban (Invitrogen Corp., San Diego, CA), hogy megkapjuk a pTAAGEI plazmidot. A pBSAG3A plazmidot, ami az alfa-galaktozidáz A cDNS szekvencia legnagyobb részét tartalmazza, és a pTAAGEI



plazmidot, ami az alfa-galaktozidáz A cDNS 5' végét tartalmazza, egyaránt SacII és NcoI restriktációs enzimmel emésztjük. Az amplifikált DNS fragmensben levő releváns SacII és NcoI hasítási helyeket a 2. ábrán mutatjuk be. A pTAAGEI plazmidból izoláljuk 0,2 kilobázis méretű SacII-NcoI fragmenst, és az ekvivalens módon emésztett pBSAG3A plazmidba ligáljuk. Ez a plazmid, a pAGAL tartalmazza a komplett alfa-galaktozidáz A cDNS szekvenciát, beleértve az alfa-galaktozidáz A szignálpeptidet tartalmazó szekvenciát is. A cDNS-t teljesen szekvenáltuk (lásd a 3. ábrán, beleértve az alfa-galaktozidáz A szignálpeptidet is; 3. számú szekvenciavázlat), és ebből kiderült, hogy azonos a humán alfa-galaktozidáz A cDNS publikált szekvenciájával (Genbank HUMGALA szekvencia).

A pXAG-16 plazmidot számos intermediéren keresztül állítjuk elő, az alábbiak szerint. Először, a pAGAL plazmidot SacII és XhoI restriktációs enzimekkel emésztjük, majd tompavégűvé alakítjuk át. Másodszor, a komplett alfa-galaktozidáz A cDNS végeit az XbaI linkerekhez ligáljuk, majd az XbaI restriktációs enzimmel emésztett pEF-BOS plazmidba [Mizushima és mtsai: *Nucleic Acids Research* 18, 5322 (1990)] szubklónozzuk, így kapjuk a pXAG-1 plazmidot. Ez a konstrukció tartalmazza a humán granulocita telepserkentő faktor (G-CSF) 3' UTS-t, és a humán elongációs faktor-1a (EF-1a) promotert, ami az alfa-galaktozidáz A-t plusz az alfa-galaktozidáz A szignálpeptidet kódoló cDNS határol, oly módon, hogy az alfa-galaktozidáz A cDNS 5' vége az EF-1a promoterhez van fuzionáltatva. Egy olyan konst-



rukciónak az előállításához, ami tartalmazza a CMV IE promotert és az első intront, az alfa-galaktozidáz A cDNS-t és a G-CSF 3' UTS-t egy 2 kilobázis méretű XbaI-BamHI fragmens formájában eltávolítjuk a pXAG-1-ből. A fragmenst tompavégűvé tesszük, BamHI linkerekhez ligáljuk, majd BamHI restrikciós enzimmel emésztett pCMVflpNeo plazmidba (amit az alábbiakban ismertett módon állítunk elő) inszertáljuk. Az orientációja olyan, hogy az alfa-galaktozidáz A cDNS 5' vége van fuzionáltatva a CMV IE promoter régióhoz.

A pCMFflpNeo plazmidot az alábbiak szerint állítjuk elő. Egy CMV IE gén promoter fragmenst polimeráz láncreakcióval amplifikálunk, templátként a CMV genomiális DNS-t használva, és az 5'-TTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGACTAG-3' (10. számú szekvenciavázlat) valamint az 5'-TTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC-3' (11. számú szekvenciavázlat) oligonukleotidot használva primerként. A kapott terméket (egy 1,6 kilobázis méretű fragmens) BamHI restrikciós enzimmel emésztjük, így kapunk egy CMV promotert tartalmazó fragmenst, tapadós BamHI végekkel. A neo expressziós egységet a pMCIneoA plazmidból (Stratagene Inc., LaJolla, CA) izoláljuk egy 1,1 kilobázis méretű fragmens formájában. A CMV promotert és a neo fragmenseket tartalmazó fragmenseket egy BamHI és XhoI restrikciós enzimekkel emésztett plazmidba (pUC12) ligáljuk. Figyelemre méltó, hogy a pCMVflpNeo tartalmazza a CMV IE promoter régiót, ami az 546-os nukleotidnál kezdődik, és a 2105-ös nukleotidnál végződik Genbank HS5MIEP szekvencia), és a neomicin-



rezisztencia gént a herpes simplex vírus (HSV) timidin kináz promoter (a Tkneo gén) hajtja meg, közvetlenül a 5' pozícióban a CMV IE promoter fragmenshez viszonyítva. A neo gén transzkripciójának iránya ugyanaz, mint a CMV promoter fragmensé. Ennek az intermedier konstrukciónak a pXAG-4 jelölést adtuk.

Ahhoz, hogy a hGH 3' UTS-t hozzáadjuk, a GCSF 3' UTS-t egy XbaI-SmaI fragmens formájában eltávolítjuk a pXAG-4 plazmidból, majd a pXAG-4 plazmid végeit tompa végekké alakítjuk. A hGH 3' UTS-t egy 0,6 kilobázis méretű EcoRI-SmaI fragmens formájában távolítjuk el a pXGH5 plazmidból [Selden és mtsai: *Molecular & Cellular Biology* 6, 3173-3179 (1986)]. Ezt a fragmenst tompavégű fragmenssé való alakítása után a pXAG-4 plazmidba ligáljuk, közvetlenül a pXAG-4 tompavégűvé tett XbaI hasítási helye után. Ennek az intermediernek a jelzése pXAG-7. Ebből a plazmidból egy HindIII-ClaI fragmens formájában eltávolítjuk a Tkneo fragmenst, és a plazmid végeit tompa végekké alakítjuk át a DNS polimeráz I Klenow fragmensével „feltöltve” azokat. Az SV40 korai promoterrel meghajtott neomicin-rezisztencia gént egy tompa végű ClaI-BsmBI fragmensbe ligáljuk, ami a pcDNeo emésztéséből származik [Chen és mtsai: *Molecular & Cellular Biology* 7, 2745-2752 (1987)], ezzel a neo transzkripciós egységet ugyanabban az orientációban elhelyezve, mint az alfa-galaktozidáz A transzkripciós egységet. Ennek az intermediernek a jelzése pXAG-13.

A pXAG-16 teljes elkészítéséhez, amiben van 26 aminosavból álló hGH szignálpeptidet kódoló szekvencia, és a hGH gén



első intronja, a pXAG-13 plazmidnak egy 2,0 kilobázis méretű EcoRI-BamHI fragmensét eltávolítjuk. Ez a fragmens tartalmazza az alfa-galaktozidáz A cDNS-t és a hGH 3' UTS-t. Ezt a nagy fragmenst 3 fragmenssel helyettesítjük. Az első fragmens tartalmazza a pXGH5 egy 0,3 kilobázis méretű polimeráz láncreakció termékét, ami tartalmazza a hGH szignálpeptidet kódoló szekvenciát és tartalmazza a hGH első intron szekvenciáját, egy szintetikus BamHI hasítási helytől, ami közvetlenül a konszenzus Kozak szekvencia előtt (upstream) helyezkedik el, a hGH szignálpeptidet kódoló szekvencia végéig. Az alábbi oligonukleotidokat használjuk ennek a fragmensnek (1-es fragmens) az amplifikálására: 5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3' (HGH101 oligonukleotid, 12. számú szekvenciavázlat) és 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTCTTGAA-3' (HGH102 oligonukleotid, 13. számú szekvenciavázlat). A második fragmens egy 0,27 kilobázis méretű polimeráz láncreakció termék, ami olyan szekvenciákat tartalmaz, amik megfelelnek a 398 aminosavból álló alfa-galaktozidáz A enzimet kódoló cDNS starthelyének (azaz hiányzik belőle az alfa-galaktozidáz A szignálpeptid) az NheI hasítási helyig. Az alábbi oligonukleotidokat használjuk ennek a fragmensnek (2-es fragmens) az amplifikálására: 5'-TTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3' (AG10 oligonukleotid, 14. számú szekvenciavázlat) és 5'-TTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3' (AG11 oligonukleotid; 15. számú szekvenciavázlat). A harmadik fragmens tartalmazza a pXAG-7 NheI-EcoRI fragmensét, ami tartalmazza az alfa-galaktozidáz A szekvencia többi részét, valamint a hGH 3' UTS-t (3-as fragmens).



Az 1-es fragmenst (BamHI és NaeI restrikciós enzimekkel emésztve), a 2-es fragmenst (PvuII és NheI restrikciós enzimekkel emésztve), valamint a 3-as fragmenst a pXAG-13 plazmid 6,5 kilobázis méretű BamHI-EcoRI fragmensével keverjük össze, ami tartalmazza a neo gént és a CMV IE promotert, majd ezeket ligálva kapjuk a pXAG-16 plazmidot (4. ábra).

1.2 A pXAG-28 alfa-galaktozidáz A expressziós plazmid készítése

A humán kollagén $\alpha 2$ promotert az alábbiak szerint izoláljuk a pXAG-28 alfa-galaktozidáz A expressziós konstrukcióban való felhasználáshoz. A humán genomiális DNS egy 408 bázispár méretű polimeráz láncreakció fragmensét, ami a humán kollagén $\alpha 2$ promoter egy részét tartalmazza, az alábbi oligonukleotidok alkalmazásával izoláljuk:

5'-TTTGGATCCGTGTCCCATAGTGTTTCCAA-3' (72-es oligonukleotid, 16. számú szekvenciavázlat); és

5'-TTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3' (73-as oligonukleotid, 17. számú szekvenciavázlat).

Ezt a fragmenst használjuk egy humán leukocita könyvtár (az EMBL3-ban) átvizsgálására ((Clontech, Palo Alto, CA). Egy pozitív klónt (7H fág) izoláltunk, ami egy 3,8 kilobázis méretű EcoRI fragmenst tartalmaz, majd SpeI restrikciós enzimmal emésztett pBSISK+ plazmidba építjük be, ami a pBSISK+ polilinkerbe hasít, majd „feltöltjük” a DNS polimeráz I Klenow fragmensével, és beépítjük az 5'-CTAGTCCTAGGA-3' oligonukleotidot (18. számú

szekvenciavázlat). A pBSIISK+-nak ezt a variánsát BamHI és AvrII restriktációs enzimekkel emésztjük, majd az előzőekben ismertett eredeti 408 bázispár méretű kollagén I α 2 promoter polimeráz láncreakció fragmensnek a 121 bázispár méretű BamHI-AvrII fragmensébe ligáljuk, így kapjuk a pBS/121COL.6 plazmidot.

A pBS/121COL.6 plazmidot XbaI restriktációs enzimmel emésztjük, ami a pBSIISK+ polilinker szekvenciájába hasít, majd „feltöltjük” a DNS polimeráz I Klenow fragmensével, és AvrII restriktációs enzimmel emésztjük. A pBS/7.2 plazmid 3,8 kilobázis méretű BamHI-AvrII méretű fragmensét izoláljuk, majd a BamHI hasítási helyet Klenow enzimmel kezelve tompavégűvé tesszük. A fragmenst azután AvrII restriktációs enzimmel emésztjük, és az AvrII restriktációs enzimmel emésztett vektorba ligáljuk, ezzel létrehozva a pBS/121bpCOL7H.18 kollagén promoter plazmidot.

Ezután a kollagén promotert fúzionáltatjuk a humán β -aktin gén 5' UTS-ével, ami tartalmazza a humán β -aktin gén első intronját. Ennek a szekvenciának az izolálására egy 2 kilobázis méretű polimeráz láncreakció fragmenst izolálunk humán genomiális DNS-ből, az alábbi oligonukleotidok használatával:

5'- TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3' (BA1 oligonukleotid, 19. számú szekvenciavázlat) és

5'- TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC-3' (BA2 oligonukleotid, 20. számú szekvenciavázlat).

Ezt a fragmenst BamHI és BsiHKAI restriktációs enzimekkel emésztjük, hogy felszabadítsuk a β -aktin 5' UTS-t és intront tartalmazó 0,8 kilobázis méretű fragmenst. Ezután egy 3,6 kilobázis

méretű Sall-SrfI fragmenst izolálunk a pBS/121bpCOLH.18 kollagén promoter plazmidból, az alábbiak szerint: a pBS/121bpCOLH.18 plazmidot részlegesen emésztjük BamHI restrikciós enzimmal (a BamHI hasítási hely a kollagén $\alpha 2$ promoter fragmens 5' végén található), majd Klenow fragmenssel kezelve tompavégűvé tesszük, és a Sall linkerhez (5'-GGTCG-ACC-3') ligáljuk, ezzel egy Sall hasítási helyet helyezve el a kollagén $\alpha 2$ promoter elé (upstream). Ezt a plazmidot azután Sall és SrfI restrikciós enzimekkel emésztjük (az SrfI hasítási hely 110 bázispárral a kollagén $\alpha 2$ promoter CAP helye előtt), majd izoláljuk a 3,6 kilobázis méretű fragmenst. A 0,8 és 3,6 kilobázis méretű fragmenseket Sall és BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pBSISK plazmiddal (Stratagene Inc., LaJolla, CA) kombináljuk, valamint egy olyan fragmenssel, amit az alábbi négy, egymáshoz illesztett oligonukleotidból állítunk össze (ezzel egy tompa és egy BsiHKA I végű fragmenst hozva létre):

5'- GGGCCCCCAGCCCCAGCCCTCCCATTTGGTGGAGGCCCTTT-TGGAGGCACCCTAGGGCCAGGAACTTTTGCCGTAT-3' (COL-1 oligonukleotid, 21. számú szekvencia),

5'- AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTTAGCACCACGGCC-GCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCA-3' (COL-2 oligonukleotid, 22. számú szekvencia),

5'- TGCCCTATTTATACGGCAAAAGTTTCCTGGCCCTAGGGTGCC-TCCAAAAGGGCCTCCACCAATGGGAGGGCTGGGGCTGGGGGCC C-3' (COL-3 oligonukleotid, 23. számú szekvencia) és



5'- CGCGGGGCGGACGCGGTCTCGGCGGCCGTGGTGCTAAAAT-AATAAAGCCCGGATC-3')COL-4 oligonukleotid, 24. számú szekvencia).

Ez a négy oligonukleotid egymáshoz illesztve megfelel a kollagén promoter SrfI hasítási helyénél kezdődő régióknak, és tovább folytatódik a β -aktin promoter BsiHKAI hasítási helyén keresztül. A kapott plazmid jelölése pCOL/ β -aktin.

Ahhoz, hogy teljessé tegyük a pXAG-28 készítését, izoláljuk a pCOL/ β -aktin Sall-BamHI fragmensét, ami a kollagén $\alpha 2$ promotert és a β -aktin 5' UTS-t tartalmazza. Ezt a fragmenst a pXAG-16-ból származó két fragmenshez ligáljuk (lásd az 1.1 pontot és a 4. ábrát): 1) a 6,0 kilobázis méretű BamHI fragmens (ami tartalmazza a neo gént, a plazmid-gerincet, a 398 aminosavból álló alfa-galaktozidáz A enzimet kódoló cDNS-t és a hGH 3' UTS-t); és 2) a 0,3 kilobázis méretű BamHI-XhoI fragmens (ami tartalmazza a pcDneo-ból származó SV40 poli A szekvenciát). A pXAG28 tartalmazza a kollagén $\alpha 2$ promotert a humán β -aktin 5' UTS-hez fuzionáltatva, a hGH szignálpeptidet (amit megszakít a hGH első intronja), az alfa-galaktozidáz A enzimet kódoló cDNS-t és a hGH 3' UTS-t. A teljes pXAG-29 expressziós konstrukció térképét az 5. ábrán mutatjuk be.

1.3 Az alfa-galaktozidáz A expressziós plazmiddal elektroporált fibroblasztok transzfekciója és szelekciója

Ahhoz, hogy az alfa-galaktozidáz A-t fibroblasztokban expresszáltassuk, szekunder fibroblasztokat tenyésztünk és transz-

fektálunk a publikált eljárásoknak megfelelően (Selden és munkatársai, WO 93/09222).

A pXAG-13, pXAG-16 és pXAG-28 plazmidokat elektroporációval transzfektáljuk humán fityma fibroblasztokba, hogy stabilan transzfektált klonális sejt törzseket generáljunk, majd a kapott alfa-galaktozidáz A expressziós szintet az 1.4 pontban ismertetett módon követjük. Az alfa-galaktozidáz A normál fityma fibroblasztokban való expressziója 2-10 egység/ 10^6 sejt/24 óra tartományban van. Ezzel szemben, a transzfektált fibroblasztok átlagos expressziós szintjét a 2. táblázatban mutatjuk be.

2. Táblázat

Átlagos alfa-galaktozidáz A expressziós szintek
($\pm$ standard deviáció)

pXAG-13:	420 $\pm$ 344 E/ 10^6 sejt/nap N=26 klonális törzs (tartomány 3-1133 E/ 10^6 sejt/nap)
pXAG-16	2051 $\pm$ 1253 E/ 10^6 sejt/nap N=24 klonális törzs (tartomány 422-5200 E/ 10^6 sejt/nap)
pXAG-28	141 $\pm$ 131 E/ 10^6 sejt/nap N=38 klonális törzs (tartomány 20-616 E/ 10^6 sejt/nap)

Ezek az adatok azt mutatják, hogy mindhárom expressziós konstrukció képes többszörösére növelni az alfa-galaktozidáz A



expresszióját a nem-transzfektált fibroblaszt törzsekkel összehasonlítva. A pXAG-13 plazmiddal, ami az alfa-galaktozidáz A-t az alfa-galaktozidáz A szignálpeptidhez kapcsolva kódolja, stabilan expresszált fibroblasztokban az expresszió szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint a pXAG-16-tal transzfektált fibroblasztokban, ami csak abban tér el az előzőtől, hogy a szignálpeptid a hGH szignálpeptid, aminek a kódoló szekvenciáját megszakítja a hGH gén első intronja.

Valahányszor a transzfektált sejteket átoltjuk, a kiválasztott alfa-galaktozidáz A aktivitást meghatározzuk, a sejteket megszámoljuk, és kiszámítjuk a sejtsűrűséget. A begyűjtött sejtek száma és az alfa-galaktozidáz A szekretálására adott idő alapján meghatározzuk a specifikus expressziós rátát, és a 3. valamint a 4. táblázatban szekretált alfa-galaktozidáz A egységek per 10^6 sejt per 24 órás periódus formájában adjuk meg. Azoknak a sejt törzseknek, amik a génterápiához, vagy az alfa-galaktozidáz A tisztítására használt anyag előállításához megfelelnek, több átoltás után is stabil növekedést és expressziót kell mutatniuk. A 3. és 4. táblázatban bemutatott sejt törzsekből származó adatok, amely törzsek stabilan transzfektálva vannak a pXAG-16 expressziós konstrukcióval, illusztrálják azt a tényt, hogy az alfa-galaktozidáz A expresszió stabilan fennmarad több átoltás után is.

3. Táblázat

A pXAG-16 alfa-galaktozidáz A expressziós konstrukciót tartalmazó BRS-11 sejtek növekedése és expressziója

Átoltás	Expresszió (egység/10 ⁶ sejt/24 óra)	Sejtsűrűség (sejt/cm ²)
13	2601	4,80×10 ⁴
14	1616	4,40×10 ⁴
15	3595	4,80×10 ⁴

4. Táblázat

A pXAG-16 alfa-galaktozidáz A expressziós konstrukciót tartalmazó HF-503-242 sejtek növekedése és expressziója

Átoltás	Expresszió (egység/10 ⁶ sejt/24 óra)	Sejtsűrűség (sejt/cm ²)
5	4069	2,80×10 ⁴
6	7585	3,55×10 ⁴
7	5034	2,48×10 ⁴

1.4 Az alfa-galaktozidáz A expresszió mennyiségi meghatározása

Az alfa-galaktozidáz A aktivitást a vízoldható 4-metilumbel-liferil- α -D-galaktopiranoziddal szubsztráttal mérjük (4-MUF-gal; Research Products, Inc.) az Ioannou és munkatársai által publikált protokoll módosításával [Ioannou és mtsai: *Journal of Cell Biology* 119, 1137-1150 (1992)]. A szubsztrátot szubsztrát pufferben oldjuk (0,1 mol/l citrát-foszfát, pH=4,6), 1,69 mg/ml (5

mmol/l) koncentrációban. Általában 10 ml tenyészet felülúszót adunk 75 ml szubsztrát oldathoz. A csöveket lezárjuk és 60 percig 37 °C-on tartjuk. Az inkubációs periódus végén 2 mmol/l glicin-karbonát puffert (130 mmol/l glicin, 83 mmol/l nátrium-karbonát, pH=10,6) használunk a reakció leállítására. Az egyes minták relatív fluoreszcenciáját TK0100 fluorométerrel (Hoefer Scientific Instruments) mérjük, aminek rögzített, 365 nm-es gerjesztési hullámhossza van, és rögzített, 460 nm-es emissziós hullámhosszon mér. A mintákban mért értékeket 1 mmol/l metilumbelliferon (Sigma Chemical Co.) törzsoldatból készített standardokkal hasonlítjuk össze, és kiszámítjuk a hidrolizált szubsztrát mennyiségét. Az alfa-galaktozidáz A aktivitást egységekben fejezzük ki; egy egység alfa-galaktozidáz A aktivitás ekvivalens egy nanomól szubsztrát óránként való hidrolízisével 37 °C-on. A sejt-expressziós adatokat általában szekretált alfa-galaktozidáz A aktivitás/10⁶ sejt/24 óra egységekben fejezzük ki. A sejt-lizátumokban és a különböző alfa-galaktozidáz A tisztítási lépésekből (lásd az alábbiakban) vett mintákban az alfa-galaktozidáz A aktivitásának mérésére szintén ezt a módszert használjuk.

1.5 Génaktivált alfa-galaktozidáz A (GA-GAL) készítése

A génaktivált alfa-galaktozidáz A (GA-GAL) előállításához szabályozó és strukturális DNS szekvenciákat építünk be a humán alfa-galaktozidáz A kódoló szekvencia elé, a GA technológiát használva, amit lényegében az 5,733,761 számú Amerikai

Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban ismertetnek, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk. A génaktiváló szekvencia pontos beszúrása homológ rekombináció eredménye, ami a transzfektált DNS fragmenszen levő DNS és a humán sejtben az alfa-galaktozidáz A lókuszt előtt levő genomiális DNS szekvencia között játszódik le. A génaktiváló szekvencia maga is tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A-t kódoló szekvenciát, egészen a szignálpeptid szekvenciáig, de azt már nem tartalmazza. Aktivált alfa-galaktozidáz A lókuszt tartalmazó sejteket izoláltunk, és gyógyszer hatóanyag szelekciónak vetettük alá, hogy több alfa-galaktozidáz A-t termelő sejteket izoláljunk.

Egy célzó DNS szekvenciát, ami egy megfelelő génaktiváló szekvenciát tartalmaz, elektroporációval juttatunk be humán gazdasejt vonalakba. Az egyik ilyen sejtvonal a HT-1080, egy hitelesített sejtvonal, ami az ATCC-től szerezhető be (Rockville, Maryland). A pGA213C génaktiváló plazmidot, ami ilyen DNS fragmenst tartalmaz, a 9. ábrán mutatjuk be. Ez a plazmid olyan szekvenciákat tartalmaz, amiket arra terveztünk, hogy aktiválják az endogén alfa-galaktozidáz A lókuszt a gazdasejt vonalban, és tartalmaz szignálpeptidet kódoló szekvenciákat, de nem tartalmaz humán alfa-galaktozidáz A-t kódoló szekvenciákat. A célzó konstrukciók tartalmaznak expressziós kazettákat a bakteriális neo és egér dhfr génekhez. Ez lehetővé teszi a stabilan integrálódó célzó fragmensek szelektálását (a neo gén használatával) és az ezt követő szelekciót a dhfr gén használatával, a lépésenkénti metotrexát (MTX) szelekciós módszert használva.



Emellett a pGA213C tartalmaz olyan szekvenciákat is, amiket arra terveztünk, hogy az endogén alfa-galaktozidáz A lókusztól levő kromoszómális szekvenciákat célozzák meg homológ rekombinációval. Az endogén alfa-galaktozidáz A lókusztól és a pGA213C 9,6 kilobázis méretű fragmens közötti homológ rekombinációt a 10. ábrán mutatjuk be.

A pGA213C plazmidot abból a célból állítjuk elő, hogy az alfa-galaktozidáz A iniciáló metionin kodonjához viszonyított -1183-as pozíciótól a -222-es pozícióig terjedő 962 bázispár méretű genomiális szekvenciát kivágjuk, amikor a pGA213C fragmens homológ rekombinálódik az X kromoszóma alfa-galaktozidáz A lókuszával. Az alfa-galaktozidáz A lókusztól transzkripció aktiválása a külső szabályozó-szekvenciáknak az alfa-galaktozidáz A kódoló régióba való pontos becélzásával játszódik le. A kapott GA-GAL lókuszt okozza az iniciációnak CMV promoterről való transzkripcióját, ami a CMV 1-es exonon, az aldoláz intronon és az alfa-galaktozidáz A kódoló szekvencia hét exonján és hat intronján keresztül fut. A GA-GAL mRNS translációja pre GA-GAL-t eredményez, harmincegy aminosavból álló szignálpeptiddel. A gazdasejtből való szekréció során a szignálpeptid lehasad. A pontosan becélzott sejtvonalakat először polimeráz láncreakcióval azonosítjuk, amivel az GA-GAL mRNS-t keressük. A GA-GAL mRNS-t termelő klónokról az is kiderül, hogy enzimatikusan aktív alfa-galaktozidáz A-t szekretálnak a tenyésztő közegbe. A célzási eseményt ezután a genomiális DNS



restrikciós enzimes emésztésével és Southern blot hibridizációjával igazoljuk.

A sejteket lépésenként növekvő metotrexát („MTX”) szelekciónak vetjük alá. A 0,05 $\mu\text{mol/l}$ MTX-ben végzett szelekció után sejtek egy klónját izoláljuk, majd 0,1 $\mu\text{mol/l}$ MTX szelekciónak vetjük alá. Ebből az eljárásból 0,1 $\mu\text{mol/l}$ MTX-re rezisztens sejtek pool-ját kapjuk (RAG001), amit tenyésztetben szaporítunk és jellemzünk.

2. Példa

alfa-galaktozidáz A tisztítás

Az alábbiakban ismertetett eljárás egy előnyben részesített eljárás az alfa-galaktozidáz A előállítására, tisztítására és tesztelésére. A tisztítási eljárás az alfa-galaktozidáz A-t oldható, aktív, természetes formában tartja a tisztítás során. A fehérjét nem hozzuk érintkezésbe szélsőséges pH-val, szerves oldószerekkel vagy detergenssekkel, nem szenved proteolitikus hasadást a tisztítás eljárás során, és nem képez aggregátumokat. A tisztítási eljárást úgy terveztük meg, hogy ne változtassa meg az alfa-galaktozidáz A glikoformák eloszlását.

2.1 Az alfa-galaktozidáz A tisztítása

A 2.1 fejezetben azt illusztráljuk, hogy az alfa-galaktozidáz A közel homogenitásig tisztítható a tenyésztett humán sejt törzsek (amiket stabilan transzfektáltunk az enzim előállításához) kondicionált közegéből, amiben egymás után öt kromatográfiás



lépést használunk. Az öt lépésben különböző elválasztási elveket használunk, amik az enzim eltérő fizikai tulajdonságait használják ki, hogy az alfa-galaktozidáz A-t elválasszák a szennyező anyagoktól. Ide tartozik a hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia butil Sepharose-on, az ionos kölcsönhatáson alapuló kromatográfia hidroxipatiton, az anioncserélő kromatográfia Q Sepharose-on, és a méretkizárásos kromatográfia Superdex 200-on. Amellett, hogy a tisztítási eljárás utolsó lépése, a méretkizárásos kromatográfia hatásos eszközt biztosít a tisztított fehérje kissereléssel kompatibilis pufferbe való juttatására.

A. A Butyl Sepharose kromatográfia használata első lépésként az alfa-galaktozidáz A tisztítása során

1,34 liter hideg, kondicionált táptalajt centrifugálással tisztítunk, majd átszűrünk egy 0,45 μm -es cellulóz-acetát pufferen, üvegszál előszűrők alkalmazásával. Kevertetés közben a hideg, megszűrt közeg pH-ját 5,6-ra állítjuk, 1 mol/l sósav cseppenként történő hozzáadásával, majd ammónium-szulfátot adunk hozzá 0,66 mol/l végkoncentrációban, 3,9 mol/l ultratiszta törzsoldat (szobahőmérséklet) cseppenként történő hozzáadásával. A közeget további 5 percig 4 °C-on kevertetjük, az előzőekben ismertett módon megszűrjük, majd Butyl Sepharose 4 Fast Flow oszlopra visszük (81 ml az oszloptérfogat, 2,5×16,5 cm; Pharmacia, Uppsala, Svédország), amit 10 mmol/l MES-TRISZ oldattal (A puffer, pH=5,6, 0,6 mol/l ammónium-szulfátot tartalmaz) hozunk egyensúlyba. A kromatográfiát 4 °C-on hajtjuk végre egy



Gradi-Frac™ System-en (Pharmacia, Uppsala, Svédország), amit in-line UV detektorral (280 nm) és vezetőképesség monitorokkal szereltünk fel, hogy megbecsüljük az össz-fehérjét és a sókoncentrációt. Miután a mintát 10 ml/perc sebességgel felvittük az oszlopra, az oszlopot 10 oszloptérfogat A pufferral mossuk. Az alfa-galaktozidáz A-t a Butyl Sepharose oszlopról 14 oszloptérfogatnyi A puffertől (ami ammónium-szulfátot tartalmaz) 10 mmol/l MES-TRISZ, pH=5,6-ig (nincs benne ammónium-szulfát) terjedő lineáris gradienssel eluáljuk. A frakcióknak 4-MUF-gal esszével vizsgáljuk az alfa-galaktozidáz A aktivitását, majd a megfelelő enzimaktivitást mutató frakciókat egyesítjük. Amint az a 8. ábrán és a tisztítási összefoglalóban (5. táblázat) látható, ez a lépés a szennyező fehérjének körülbelül 99%-át eltávolítja (oszloposítás előtti minta=8,14 g össz-fehérje; oszloposítás utáni minta=0,0638 g össz-fehérje).

5. Táblázat

Az alfa-galaktozidáz A tisztítása stabilan transzfektált humán fibroblasztok kondicionált táptalajából

Tisztítási lépés	Térfogat (ml)	α -Gal A aktivitás ($\times 10^6$ egység)	Összfehérje (mg)	Specifikus aktivitás ($\times 10^6$ egység/mg)	A tisztítás mértéke (kumulatív)	A kinyerés százaléka
Tenyészet felülúszó	1340	14,6	8140	0,0018	=1	=100
Butil Sepharose	417	14,1	63,8	0,221	123	96,6
Heparin Sepharose	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Hidroxiapatit	47	9,73	4,46	2,18	1220	66,6
Q Sepharose	31,5	8,91	3,31	2,69	1503	61,0
Superdex 200	10	8,58	2,93	2,92	1634	59,0



B. Heparin Sepharose kromatográfia használata az alfa-galaktozidáz A tisztítási lépéseként

A Butil Sepharose oszlopról lejöő csúcsok frakcióit 4 °C-on 4 liter 10 mmol/l MES-TRISZ (pH=5,6) pufferrel szemben dializáljuk (egyszer cserélve). A dializátum vezetőképességét víz vagy nátrium-klorid (ahogy szükséges) hozzáadásával 1,0 mMHO-ra állítjuk 4 °C-on. Ezután a mintát Heparin Sepharose 6 Fast Flow oszlopra (Pharmacia, Uppsala, Svédország; 29 ml oszloptérfogat, 2,5×6 cm) visszük, amit 10 mmol/l MES-TRISZ-szel (pH=5,6, ami 9 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz, ez a B puffer) hoztunk egyensúlyba. Ezt 4 °C-on hajtjuk végre 10 ml/perc sebességgel. In-line UV detektorral (280 nm) és vezetőképesség monitorokkal mérjük az össz-fehérjét és a sókoncentrációt. Miután a mintát felvittük, az oszlopot 10 oszloptérfogatnyi B pufferrel mossuk, majd 3 oszloptérfogatnyi lineáris gradienssel, ami 8% C puffer/92% B puffer (ahol a C puffer összetétele 10 mmol/l MES-TRISZ, pH=5,6, 250 mmol/l nátrium-kloridot tartalmaz), majd 10 oszloptérfogatnyi 8%-os C pufferrel mossuk. Ezt követi az alfa-galaktozidáz A elúciója 1,5 oszloptérfogatnyi lineáris gradienssel, ami 29% C pufferig terjed, majd 10 oszloptérfogatnyi lineáris gradienssel, ami 35% C pufferig terjed. A frakcióknak vizsgáljuk az alfa-galaktozidáz A aktivitását, majd az elfogadható aktivitást mutató frakciókat egyesítjük.

C. Hidroxiapatit kromatográfia az alfa-galaktozidáz A tisztítási lépésében

A heparin pool-t megszűrjük, majd közvetlenül Ceramic Hydroxyapatite HC oszlopra (4 µm; American International



Chemical, Natick, MA; 12 ml oszloptérfogat, 1,5×6,8 cm) visszük, amit 1 mmol/l nátriumfoszfáttal (pH=6,0, D puffer) hoztunk egyensúlyba. A kromatográfiát szobahőmérsékleten hajtjuk végre hibrid Gradi-Frac™/FPLC System (Pharmacia, Uppsala, Svédország) hajtjuk végre, amit in-line UV detektorral (280 nm) és vezetőképesség monitorral szereltünk fel. Miután a mintát felvittük (5 ml/perc sebességgel), az oszlopot 10 oszloptérfogatnyi D pufferrel mossuk. Az alfa-galaktozidáz A-t 7 oszloptérfogatnyi lineáris gradienssel eluáljuk, ami 42% E puffer/58% D puffer között változik (az E puffer 250 mmol/l nátriumfoszfát, pH=6,0), majd 10 oszloptérfogatnyi, 52% E pufferig terjedő gradienssel eluáljuk. A frakcióknak vizsgáljuk az alfa-galaktozidáz A aktivitását, és az elfogadható aktivitással rendelkező frakciókat egyesítjük.

D. Q Sepharose anioncserélő kromatográfia használata az alfa-galaktozidáz A tisztítási lépéseként

A hidroxipatit pool-t vízzel körülbelül 1,5-szeresre hígítottuk, ezzel szobahőmérsékleten a végső vezetőképessége 3,4-3,6 mMHO. Szűrés után a mintát Q Sepharose HP oszlopra (Pharmacia, Uppsala, Svédország; 5,1 ml oszloptérfogat, 1,5×2,9 cm) visszük, amit 10% G puffer/90% F pufferrel huztunk egyensúlyba, ahol az F puffer 25 mol/l nátriumfoszfát, pH=6,0, a G puffer pedig 25 mmol/l nátriumfoszfát, pH=6,0, 250 mmol/l nátrium-klorid. A kromatográfiát szobahőmérséklet hajtjuk végre Gradi-Frac™/FPLC hibrid rendszerrel (Pharmacia, Uppsala, Svédország), majd az össz-fehérjét és a sókoncentrációt az in-line monitorral követjük. A mintát 5 ml/perc sebességgel visszük fel,

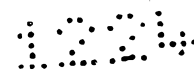


majd az alábbi lépéseket hajtjuk végre: 1) 5 oszloptérfogatnyi mosás 10% G pufferrel, 2) 7 oszloptérfogatnyi mosás 12% G pufferrel, 3) 3 oszloptérfogatnyi lineáris gradiens, ami 50% G pufferig terjed, 4) 10 oszloptérfogatnyi lineáris gradiens 53% G pufferig, 5) 3 oszloptérfogatnyi gradiens 100% G pufferig, és 6) 10 oszloptérfogatnyi mosás 100% G pufferrel. Az alfa-galaktozidáz A főleg a 3. és 4. lépésben eluálódik. Az elfogadható aktivitást tartalmazó frakciókat egyesítjük (a „Q pool”).

E. Superdex-200 gelszűrés kromatográfia az alfa-galaktozidáz A tisztítási lépéseként

A Q pool-t körülbelül ötszorosra töményítjük, Centriprep-10 centrifugális koncentrátor egységekkel (Amicon, Beverly, MA), majd Superdex 200 oszlopra visszük (Pharmacia, Uppsala, Svédország; 189 ml oszloptérfogat, 1,6×94 cm). Az oszlopot 25 mmol/l nátriumfoszfáttal, pH=6,0, és 150 mmol/l nátrium-kloridot tartalmaz hozzuk egyensúlyba és ezzel eluáljuk. A kromatográfiát FPLC rendszerrel (Pharmacia, Uppsala, Svédország) hajtjuk végre szobahőmérsékleten, egy in-line UV monitor (280 nm) használatával, hogy kövessük a fehérje elúcióját. Az oszlopra vitt minta térfogata ≤ 2 ml, az áramlási sebesség 0,5 ml/perc, és a frakció mérete 2 ml. Többször futtatjuk az oszlopot, majd a frakcióknak vizsgáljuk az alfa-galaktozidáz A aktivitását, és az elfogadható aktivitást mutató frakciókat egyesítjük.

A Superdex 200 oszlopról származó egyesített frakciókat Centriprep 10 egységekkel koncentrálnak, alikvot részekre osztjuk, hirtelen lefagyasztjuk, majd rövid ideig -80 °C-on tároljuk.



Az alfa-galaktozidáz A tisztításnak ezt a példáját az 5. táblázatban mutatjuk be. Az alfa-galaktozidáz A végső hozama a kiindulási anyag aktivitására számítva 59% volt, és a tisztított termék mennyisége $2,92 \times 10^6$ egység/mg fehérje. A kapott termék nagyon tisztának bizonyult, 4-15% SDS-poliakrilamid gélen redukáló körülmények között végzett elektroforézissel, ami után ezüstoffestést alkalmazunk.

Összefoglalás

A tisztítási eljárással erősen tisztított alfa-galaktozidáz A-t kapunk. A tisztítás az eljárásnak főleg az első két lépésében játszódik le, míg az utolsó három lépés csak az anyag „polírozását” szolgálja, a megmaradt minor szennyeződések eltávolításával. Az utolsó lépés, a méretkizárásos kromatográfia Superdex 200-on szintén azt a célt szolgálja, hogy az alfa-galaktozidáz A-t egy kissereléssel kompatibilis pufferbe juttassa.

2.2 A stabilan transzfektált humán sejtek tenyésztésében termelt alfa-galaktozidáz A mérete

A tisztított humán alfa-galaktozidáz A strukturális és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk. A kapott termék tisztasága nagyon magasnak bizonyult 4-15%-os SDS-poliakrilamid gélen, redukáló körülmények között, ezüstoffestés után.

Az alfa-galaktozidáz A molekulatömegét MALDI-TOFF tömegspektroszkópiával becsültük meg. Ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy a dimer molekulasúlya 102,353 Da, míg a

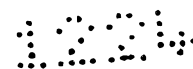


monomer molekulásúlya 51,002 Da. A monomer várt molekulásúlya az aminosav összetétel alapján 45000 Da. Tehát az enzim szénhidrát tartalma 5600 Da.

2.3 A stabilan transzfektált humán sejtek által termelt alfa-galaktozidáz A szénhidrát módosítása

A jelen találmány szerinti eljárással előállított alfa-galaktozidáz A glikozilezési mintázatát is kiértékeltük. A helyes glikozilezettség fontos az alfa-galaktozidáz A optimális *in vivo* aktiválásához; a nem-glikozilező rendszerekben expresszált alfa-galaktozidáz A inaktív vagy instabil [Hantzopolous és mtsai: Gene 57, 159 (1987)]. A glikozilezés az alfa-galaktozidáz A-nak a kiválasztott célsejtekbe való bejutásához is fontos, és érinti az enzim *in vivo* keringési felezési idejét. Az alfa-galaktozidáz A mindegyik alegységén négy hely található az aszparaginhoz kötött szénhidrát láncok hozzáadásához, amik közül csak három foglalt [Desnick és mtsai: The Metabolic And Molecular Bases Of Inherited Disease, 2741-2780. oldal, McGraw Hill, New York (1995)].

A stabilan transzfektált sejtek által termelt alfa-galaktozidáz A mintát neuraminidázzal kezeljük, amit *A. urafaciens*-ből ((Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) izoláltak, a szialsav eltávolítására. Ezt a reakciót úgy hajtjuk végre, hogy 5 mg alfa-galaktozidáz A-t éjszakán át 10 mE neuraminidázzal kezelünk szobahőmérsékleten, 10 ml acetáttal pufferelt sóoldatban (ABS, 20 mmol/l nátrium-acetát, pH=5,2, 150 mmol/l nátrium-klorid).



A stabilan transzfektált sejtek által termelt tisztított alfa-galaktozidáz A-t defoszforilezzük is, alkalikus foszfatáz használatával (borjúbél alkalikus foszfatáz, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), oly módon, hogy 5 mg alfa-galaktozidáz A-t éjszakán át szobahőmérséklet kezelünk 15 E alkalikus foszfatázzal ABS-ben (a pH-t 1 mol/l TRISZ-szel 7,5-re emeljük).

A mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel és/vagy izoelektromos fókuszálással elemezzük, majd Western blottot hajtunk végre eg anti-alfa-galaktozidáz A-specifikus ellenanyaggal. A használt ellenanyag nyúl poliklonális anti-peptid ellenanyag, amit immunogénként az alfa-galaktozidáz A 68-81-es aminosavait reprezentáló peptiddel állítunk elő. A fehérje PVDF-re való átvitele után (Millipore, Bedford, MA) a membránt 1:2000 higítású antiszérummal elemezzük, 2,5% blotto-ban (zsírmentes tejpor 20 mmol/l TRIS-HCl-ben, pH=7,5, 0,005% Tween-20). Ezt követi tormaperoxidázhoz konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (Organo Technique/Cappella, Durham, NC; 1:5000 higítás) és az ECL kemilumineszcencia kittel (Amersham, Arlington Heights, IN) való kimutatás.

Az alfa-galaktozidáz A SDS-gélelektroforézissel való elemzés után neuraminidázzal való kezelése a molekulasúly eltolódását eredményezi (körülbelül 1500-2000 Da, vagy 4-6 szíálsav/monomer), azt sugallva, hogy az alfa-galaktozidáz A alaposan módosítva van szíálsavval. Referenciaként megemlítjük, hogy az alfa-galaktozidáz A plazma-formája monomerenként 5-6 szíálsav csoportot tartalmaz, és a placentális forma 0,5-1 szíálsavat tartalmaz monomerenként [Bishop és mtsai: *Journal of Biological Chemistry* 256, 1307 (1981)].



Az alfa-galaktozidáz A szíálsav és M6P modifikációja vizsgálatának egy másik módszere az izoelektromos fókuszálás (IEF), aholis a mintákat izoelektromos pontjuk (pI) vagy nettó töltésük alapján választják szét. Tehát a töltött csoportok, azaz például a szíálsav vagy a foszfát eltávolítása az alfa-galaktozidáz A-ról várhatóan megváltoztatja a fehérje mobilitását az IEF rendszerben.

Az IEF kísérlet végrehajtásához a jelen találmány szerint előállított alfa-galaktozidáz A mintákat neuraminidázzal és/vagy alkalikus foszfátázzal kezeljük, 1:1 arányban összekeverve 2X Novex mintafelvivő pufferrel (8 mol/l karbamid, pH=3,0-7,0), majd Pharmalyte-tal (Pharmacia, Uppsala, Svédország; pH=3,0-3,5; Pharmalyte 4-6,5 és 2,5-5,5, gélenként 0,25 ml) készített 6 mol/l karbamid IEF gélre (5,5% poliakrilamid) visszük. Az izoelektromos pont standardokat is használjuk (Bio-Rad). Az elektroforézist követően a gél PVDF-re visszük át, és Western blot elemzést hajtunk végre az előzőekben ismertetett módon.

Az enzim neuraminidáz kezelése növelte mindhárom izoforma pI értékét, jelezve, hogy bizonyos mértékben mindegyik szíálsavval van módosítva. Ezek az adatok azt sugallják, hogy az itt ismertetett módon előállított alfa-galaktozidáz A készítmények a kívánt plazma felezési idővel rendelkeznek, ami azt mutatja, hogy az anyag megfelel a farmakológiai felhasználáshoz. Emellett, a neuraminidázzal kezelt alfa-galaktozidáz A alkalikus foszfátázzal való kezelése tovább növelte a fehérje egy részének pI értékét, körülbelül 5,0-5,1-re, ami azt mutatja, hogy az enzim egy vagy több M6P csoporttal rendelkezik. Erre a módosításra azért van szükség, hogy az alfa-galaktozidáz A-t hatékonyan internalizálják a célsejtek.



Az alfa-galaktozidáz A N-kapcsolt szénhidrát láncait ioncserélő HPLC-vel (Glyco-Sep C) elemezzük, és a nem-redukáló véget fluoreszcens 2-amino benzamiddal (AB) jelöljük. A három különböző alfa-galaktozidáz A készítményből kapott AB-glikánok elemzésének eredményeit a 5. táblázatban foglaljuk össze. Mindhárom készítmény Z értéke nagyobb 170-nél. Emellett a glikánoknak több mint 67%-a szialilezve van, és a glikánoknak több mint 16%-a foszforilezve van, és kevesebb mint 16%-a semleges. Ezek az eredmények a korábban közölt eredményekhez viszonyítva nagyon kedvezőek. Például Desnick és munkatársai (5,356,804 számú Amerikai Egyesült Államokbeli szabadalmi leírás) leírták, hogy a glikánoknak több mint 60%-a semleges, és csak 11%-a szialilezett.

6. Táblázat

GA-GAL-ból származó AB-glikánok elemzésének eredményei

Kezelés	Z szám	% semleges	% Mono	% Di	% Tri	% Tetra
semmi	170,04	16,83	22,8	39,45	15,34	5,58
semmi	177,71	14,22	20,63	44,62	14,2	6,31
semmi	171,68	15,81	20,73	43,2	14,33	5,39
Átlag (N=3)	173,14	15,62	21,39	42,42	14,62	5,76
alkalikus foszfatáz	150,93	23,38	24,47	34,28	13,58	4,29



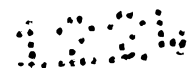
Az összes száza- léka	A jelen találmány szerinti GA-GAL készítmények	Desnick és mtsai: 5,356,804 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szaba- dalmi leírás
Össz P-glikán	16,62	24,1
Össz-szialisított	65,57	11
Össz-semleges (magas mannóz és hibrid)	15,62	62,9

A tisztított GA-GAL készítmények további részletes jellemzését a 7. táblázatban adjuk meg.

7. Táblázat

GA-GAL tisztított bulk

Esszé	40-173-KH	42-202-KH
specifikus aktivitás	2,75	2,80
SDS-PAGE Coomassie	100%	100%
SDS-PAGE ezüsfestés	99,6%	100%
fordított fázisú HPLC	100%	99,94%
méretkizárásos kroma- tográfia	0%	0,01%
Fityma fibroblasztokba való internalizáció	123,6%	94,3%



2.4 A töltött alfa-galaktozidáz A arányának növelése az alfa-galaktozidáz A fajták frakcionálásával

Amint az az előzőekben tárgyaltuk, az alfa-galaktozidáz A glikoformák frakcionálása az itt ismertetett tisztítás eljárás különböző lépéseiben lép fel. Ebben a példában az alfa-galaktozidáz A glikoformákat méret és töltés alapján frakcionáljuk. Az is lehet, hogy az alfa-galaktozidáz A-t ezeknek és más kromatográfiás lépéseknek a kombinálásával frakcionáljuk, az előzőekben ismertetett módon.

Az alfa-galaktozidáz A glikoformák méret alapján való frakcionálásához a méretkizárásos kromatográfiát Superdex 200 oszlopon hajtjuk végre (Pharmacia, 1,6 cm × 94,1 cm), foszfáttal pufferelt sóoldattal hozva egyensúlyba pH=6-on. 1 ml térfogatban 2,6 mg alfa-galaktozidáz A-t viszünk az oszlopra, majd az oszlopot 0,35 ml/perc sebességgel eluáljuk. A teljes elúciós profilban szedünk frakciókat, majd az alfa-galaktozidáz A széles elúciós csúcsát SDS-PAGE-val elemezzük, majd ezüstoffestéssel tesszük láthatóvá. A csúcs elején levő frakciók tartalmazzák a legmagasabb molekulásúlyú alfa-galaktozidáz A-t, és ahogy a frakciók folytatódtak a csúcsban, az alfa-galaktozidáz A látszólagos molekulásúlya fokozatosan lecsökkent. Az alfa-galaktozidáz A frakciókat azután szelektáljuk és egyesítjük, így kapjuk a kívánt molekulásúly tartományba tartozó alfa-galaktozidáz A készítményeket.

Az alfa-galaktozidáz A glikoformák töltés alapján való frakcionálásához az alfa-galaktozidáz A-t Q-Sepharose kromatográfiával frakcionáljuk. A Q-Sepharose oszlopot (1,5 cm × 9,4 cm) 20



mmol/l nátriumfoszfát pH=6,0, 30 mmol/l nátrium-klorid összetételű oldattal hozzuk egyensúlyba, és az áramlási sebességet 5 ml/ perc értéken tartjuk. 166 milliliter térfogatban levő 130 mg alfa-galaktozidáz A-t viszünk az oszlopra, mossuk az ekvibráló pufferrel, majd 20 mmol/l nátriumfoszfáttal (pH=6,0) eluáljuk, ami 130 mmol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Egy extenzívebb frakcionáláshoz gradiens elúciót alkalmazunk (10 oszloptérfogatnyi), ami az ekvibrációs puffertől az elúciós pufferig terjedhet. A teljes elúciós profilban szedünk frakciókat, majd az alfa-galaktozidáz A elúciós csúcsát SDS-PAGE-val elemezzük, majd ezüstoffestéssel tesszük láthatóvá. A gélen megfigyelhető alacsonyabb molekulásúlyú fajták a mosófolyadékkal és a csúcs elején eluálódnak, a magasabb molekulásúlyú glikoformák a csúcs vége felé eluálódnak. Az alacsonyabb molekulásúlyú fajták az alfa-galaktozidáz A kevésbé töltött glikoformáinak felelnek meg, amik kevésbé erősen kötődnek a töltött Q-Sepharose oszlophoz (ami kvaterner aminnal helyettesített gyantát tartalmaz). A legmagasabb negatív töltésű alfa-galaktozidáz A fajták később eluálódnak az elúciós profilban, és SDS-PAGE alapján molekulásúlyuk is nagyobb. A töltés alapján való frakcionálást az eluált frakciók vagy a kiválasztott pool-ok izoelektromos fókuszálása alapján lehet igazolni.

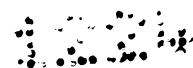
Tehát mind a méret alapján történő frakcionálás, mind a töltés alapján történő frakcionálás lehetővé teszi az alfa-galaktozidáz A erősen töltött glikoformáinak a szelektálását.



2.5 Az alfa-galaktozidáz A mannóz vagy mannóz-6-foszfát révén való internalizációja

Ahhoz, hogy a stabilan transzfektált sejtek által termelt alfa-galaktozidáz A az alfa-galaktozidáz A deficienciák hatékony terápiás ágense legyen az enzimet az érintett sejteknek internalizálniuk kell. Az alfa-galaktozidáz A minimálisan aktív fiziológias pH szinteken, például a vérben vagy az intersticiális folyadékban. Az alfa-galaktozidáz A csak akkor metabolizálja optimálisan a lipid szubsztrátokat, ha a lizoszóma savas környezetébe internalizálódik. Ezt az internalizálódást befolyásolja az alfa-galaktozidáz A-nak az M6P receptorokhoz való kötődése, amik a sejt felszínén expresszálódnak, és az enzimet az endocitózis bioszintézis úton keresztül juttatják a lizoszómába. Az M6P receptor mindenütt expresszálódik; a legtöbb szomatikus sejt bizonyos mértékben expresszálja az M6P-t. A mannóz receptor, ami a glikoproteineken levő mannóz csoportokra specifikus, kevésbé elterjedt. A mannóz receptorok általában csak a makrofágokon és a makrofág-szerű sejteken találhatók meg, és további lehetőséget biztosítanak ahhoz, hogy az alfa-galaktozidáz A bejusson ezekbe a sejt típusokba.

Ahhoz, hogy demonstráljuk az alfa-galaktozidáz A M6P által befolyásolt internalizációját, Fabry-betegségben szenvedő betegből származó bőr fibroblasztokat (NIGM Human Genetic Mutant Cell Repository) tenyésztünk éjszakán át növekvő koncentrációjú, jelen találmány szerinti tisztított alfa-galaktozidáz A jelenlétében. Néhány minta 5 mmol/l oldható M6P-t tartalmaz, ami competi-



tíve gátolja az M6P receptorhoz való kötődést, és az általuk való internalizációt. Más minták 30 mg/liter mannánt tartalmaznak, ami gátolja a mannóz receptor által történő kötődést és internalizációt. Az inkubálás után a sejteket mossuk, majd lekaparással lízis pufferbe gyűjtjük (10 mmol/l TRISZ, pH=7,2, 100 mmol/l nátrium-klorid, 5 mmol/l EDTA, 2 mmol/l Pefabloc™ ((Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) és 1% NP-40). A lizált mintáknak azután vizsgáljuk a fehérje-koncentrációját és alfa-galaktozidáz A aktivitását. Az eredményeket alfa-galaktozidáz A aktivitás/mg sejtféherje formájában fejezzük ki. A Fabry sejtek az alfa-galaktozidáz A-t dóziszfüggő módon internalizálják. Ezt az internalizációt gátolja az M6P, de a mannán nem gátolja. tehát az alfa-galaktozidáz A internalizációját a Fabry fibroblasztokba az M6P receptor befolyásolja, ed a mannóz receptor nem befolyásolja.

Az alfa-galaktozidáz A-t *in vitro* az endoteliális sejtek is internalizálják, amik a Fabry-betegség kezelésének fontos célsejtjei. Humán köldökvéna endoteliális sejteket (HUVEC-ek) tenyésztünk éjszakán át 7500 egység alfa-galaktozidáz A jelenlétében; a lukak közül néhány M6P-t tartalmaz. Az inkubálási periódus után a sejteket összegyűjtjük, és az előzőekben ismertetett módon vizsgáljuk az alfa-galaktozidáz A szempontjából. Az alfa-galaktozidáz A-val inkubált sejtekben az enzimszintek majdnem tízszer magasabbak mint a kontroll (amit nem inkubáltunk alfa-galaktozidáz A-val) sejtekben. Az M6P gátolja az alfa-galaktozidáz A intracelluláris akkumulálódását az alfa-galak-



tozidáz A-ban, jelezve ezzel, hogy az alfa-galaktozidáz A HUVEC által való internalizációját az M6P receptor befolyásolja. Tehát a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A-t klinikailag releváns sejtek internalizálják.

Kevés tenyésztett humán sejtvonalról ismert, hogy expresszálja a mannóz receptort. Azonban egy egér makrofág-szerű sejtvonal (J774.E), ami hordoz mannóz receptorokat, de nem, vagy csak nagyon csekély számban tartalmaz M6P receptorokat, használható annak meghatározására, hogy a jelen találmány szerinti tisztított alfa-galaktozidáz A-t a mannóz receptorokon keresztül internalizálják [Diment és mtsai: J. Leukocyte Biol. 42, 485-490 (1987)]. A J774.E sejteket éjszakán át tenyésztjük 10000 egység/ml alfa-galaktozidáz A jelenlétében. A kiválasztott minták tartalmazznak 2 mmol/l M6P-t, míg mások 100 mg/ml mannánt tartalmazznak. A sejteket mossuk, majd az előzőekben ismertetett módon összegyűjtjük, majd meghatározzuk, hogy az egyes mintákban mennyi az össz-fehérje és az alfa-galaktozidáz A aktivitás. Az M6P nem gátolja azt, hogy ezek a sejtek felvegyék az alfa-galaktozidáz A-t, míg a mannán körülbelül 75%-kal csökkenti az akkumulált alfa-galaktozidáz A szinteket. Tehát a jelen találmány szerinti alfa-galaktozidáz A a mannóz receptoron keresztül internalizálódhat azokban a sejtípusokban, amik ezt a bizonyos sejtfelszíni receptort expresszálják.



3. Példa

Gyógyászati készítmény

A pufferoldatok és készítmények előállítása

A tisztított bulk alfa-galaktozidáz A-t alfa-galaktozidáz A higítószerrel végső koncentrációra higítjuk. A kiszerezendő tisztított bulk térfogata alapján meghatározzuk az alfa-galaktozidáz A koncentrációját (mg/ml), és az alfa-galaktozidáz A kívánt végkoncentrációját a végső kiszerezési formában, valamint a szükséges alfa-galaktozidáz A higítószer mennyiségét. Az alfa-galaktozidáz A higítószer a felhasználás előtt maximum 24 órával készítjük el, megfelelő mennyiségű WFI-t nátrium-kloridot és egybázisú nátriumfoszfátot összekeverve, pH-ját 6,0-ra állítva nátrium-hidroxid oldattal. Az alfa-galaktozidáz A higítószer összetételét a 8. táblázatban adjuk meg.

8. Táblázat

alfa-galaktozidáz A higítószer összetétele (per liter)

Komponens	Neve	Mennyisége
nátrium-klorid (USP)	100-1916	8,8 g
nátrium-hidroxid, 5 mol/l	200-1903	amennyi a pH 6,0-ra állításához kell
nátriumfoszfát, egybázisos (USP)	100-1913	3,5 g
víz injekciózáshoz (USP)	100-2301	1 literre tölteni



Az alfa-galaktozidáz A higítószer egy literét, vagy kisebb mennyiségét vákuumszűrővel szűrjük, steril 0,2 mm-es nylon szűrők alkalmazásával (Nalgene Nubc International, Rochester, NY). A nagyobb térfogatokat pozitív nyomással szűrjük, perisztaltikus pumpát és 0,3 mm Supor kapszula szűrőket használva (Pall, Port Washington, NY). A szűrés után mindegyik szűrőt buborékpont integrálás tesztnek vetjük alá. A keverést és szűrési lépéseket tanusítvánnyal ellátott Class 100 lamináris áramlási boxban hajtjuk végre. Az alfa-galaktozidáz A higítószer a tisztított alfa-galaktozidáz A bulkhoz adjuk egy keverő edényben, így kapunk egy 1 mg/ml koncentrációjú végső oldatot. Ezután poliszorbát 20 (Tween 20, Spectrum) megfelelő térfogatát adjuk hozzá, hogy elérjük a megfelelő, 0,02% koncentrációt.

4. Példa

Deszialilezett degalaktozilezett alfa-galaktozidáz A

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a glikozilezés hatását az alfa-galaktozidáz A biológiai eloszlására, az alfa-galaktozidáz A tisztított készítményét fokozatosan deglikozilezzük, és mindegyik formáját egereknek injekciózzuk be. Az egerek szerveit az injekciózás után négy órával kivesszük, és a szöveteken immunhisztokémiai vizsgálatnak vetjük alá, hogy láthatóvá tegyük a fehérje biológiai eloszlásában esetleg fennálló változásokat.

Az alfa-galaktozidáz A-t először neuraminidázzal (szialidáz) kezeljük, hogy eltávolítsuk a szialsav csoportokat, aminek az az eredménye, hogy a galaktóz csoportok exponálódnak. Ennek a

szialidázzal kezelt anyagnak egy részét tovább reagáltatjuk β -galaktozidázzal, hogy eltávolítsuk a galaktóz-csoportokat; ez az *N*-acetilglükózamint (GlcNAc) exponálja. A GlcNAc-ket azután *N*-acetilglükózaminidázzal távolítjuk el, ezzel a fehérjén levő, a magot képező mannóz csoportokat exponáljuk. A kezeletlen alfa-galaktozidáz A-t (kontroll), vagy a fehérje egyik kezelt formáját a farki vénán keresztül injektózzuk egerekbe. Négy órával az injektózás után az egerekből a májat, a lépét, a szívet, a vesét és a tüdőket összegyűjtjük, megőrizzük, majd az alfa-galaktozidáz A kimutatásával immunológailag festjük.

Ha a kezeletlen fehérjét kapó kontroll állatokkal hasonlítjuk össze, akkor a szialidázzal kezelt enzimet (amiben a galaktóz csoportok exponálódnak) kapó egerekben több alfa-galaktozidáz A lokalizálódik a májban, és ennek megfelelően kevesebb enzim lokalizálódik más vizsgált szervekben. Emellett a májban a festési mintázat meglehetősen eltérő. A kontroll állatokban az alfa-galaktozidáz A főleg a Kupffer sejtekbe és az endoteliális sejtekbe lokalizálódik, csak közepes hepatocita festéssel. A szialidázzal kezelt alfa-galaktozidáz A-t kapó állatokban az enzim csak a hepatocitákba lokalizálódik, ami összhangban van az aszialoglikoprotein receptor ismert biológiai eloszlásával. A deglikozilezésnek ez a biológiai eloszlásra gyakorolt hatása visszafordítható, ha a galaktóz csoportokat β -galaktozidázzal eltávolítjuk. Az ezt a galaktóz egység nélküli fehérjé kapó egerek májában megfigyelt festési mintázat hasonló a kontroll állatokban kapott festési mintázathoz; a festés többsége a



Kupffer sejtekben és az endoteliális sejtekben van, minimális hepatocita festéssel. Az alfa-galaktozidáz A *N*-acetilglükóza-aminidázzal való kezelése nem változtatja meg a festési mintázatot azzal összehasonlítva, amit a β -galaktozidázzal kezelt fehérjével figyelhetünk meg; azaz, úgy tűnik, hogy az *N*-acetilglükózamin csoportok eltávolításának kicsi a hatása az alfa-galaktozidáz A biológiai eloszlására.

5. Példa

A Fabry fibroblasztok kijavitása alfa-galaktozidáz A-t expresszáló humán fibroblasztokkal

A génterápiához alfa-galaktozidáz A-t termelő autológ sejtek implantátumának az enzimet módosított formában kell termelnie, ami „kijavítja” az alfa-galaktozidáz A deficienciát a megcélzott sejtekben. Ahhoz, hogy megbecsüljük a transzfektált humán fibroblasztok átal termelt alfa-galaktozidáz A hatását a Fabry sejtekre, a Fabry-betegségben szenvedőkből vett fibroblasztokat (NIGSM Human Genetics Mutant Cell Repository) Transwells-ben (Costar, Cambridge, MA) együtt tenyésztjük egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejt törzsével (BRS-11). A Fabry sejteket 12-lukas szövettenyésztő lemezekten tenyésztjük, amik közül néhány inszerteket tartalmaz (Transwells, 0,4 mm pórusméret), amiknek a felszínén szaporodhatnak a sejtek. Az inszert növesztő mátrixa porózus, és lehetővé teszi, hogy a makromolekulák fentről eljussanak az alsó részbe. Az inszertek egy csoportja normális humán fityma (HF) fibroblasztokat tartalmaz,

amik minimális szinten expresszálódnak alfa-galaktozidáz A-t, míg más csoportok tartalmazzák a stabilan transzfektált humán fibroblaszt törzset, a BRS-11-et, ami nagy mennyiségben szekretál alfa-galaktozidáz A-t. Azokban a lukakban, amikben a sejteket alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtekkel együtt tenyésztjük, az alfa-galaktozidáz A beléphet a Fabry sejteket körülvevő közegbe, és potenciálisan bejuthat a Fabry sejtekbe.

A 9. táblázatban bemutatott adatok azt mutatják, hogy a Fabry sejtek internalizálják a szekretált alfa-galaktozidáz A-t. Az alfa-galaktozidáz A intracelluláris szintjét 3 napig követjük. Azokban a sejtekben, amiket önmagukban tenyésztünk (nincs inszert), vagy nem-transzfektált fityma fibroblasztok jelenlétében tenyésztünk (HF inszert), nagyon kicsi az alfa-galaktozidáz A aktivitás intracelluláris szintje. Azonban az alfa-galaktozidáz A-t termelő (BRS-11 inszert) együtt tenyésztett Fabry sejtekben az enzim szintje a 2. nap végén hasonló a normál sejtekben levő enzimszinthez (a normális fibroblasztok 25-80 egység alfa-galaktozidáz A-t tartalmaznak egy mg fehérjére számítva). Azt, hogy a korrekció az M6P receptor által felvett alfa-galaktozidáz A-nak tulajdonítható, az M6P-vel való inhibíció (BRS-11 inszert + M6P) demonstrálja.

9. Táblázat

A Fabry fibroblasztok korrekciója alfa-galaktozidáz A aktivitást
expresszáló humán fibroblasztokkal (egység/mg fehérje)

Idő	nincs inszert	HF inszert	BRS-11 inszert	BRS-11 inszert+M6P
1. nap	2 ±1	2 ±1	13 ± 1	4 ± 1
2. nap	2 ±1	2 ±1	40 ± 1	6 ± 1
3. nap	2 ±1	5 ±1	85 ± 1	9 ± 1

A fenti leírást kizárólag illusztrálás céljából adjuk meg, és szándékaink szerint a találmány oltalmi körét nem a leírt precíz formára korlátozza, hanem a leíráshoz csatolt igénypontokra. A csatolt igénypontok specifikációjában az egyesszám jelenthet többesszámú referenciát is, hacsak a szövegösszefüggés nem diktálja másképpen. Az ebben a specifikációban idézett összes publikációt a továbbiakban referenciaként kezeljük.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

Szekvencialista

<110> Transkaryotic Therapies, Inc.

Seldon, Richard F

Borowski, Marianne

Kinoshita, Carol M.

Treco, Douglas A

Williams, Melanie D

Schuetz, Thomas J

Daniel, Peter F

<120> Gyógyászati készítmények az alfa-galaktozidáz A deficiencia kezelésére

<130> PCT FABRY DISEASE (18082-001)

<140> PCT/US00/06118

<141> 2000-03-09

<150> USSN 09/266,014

<151> 1999-03-11

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 210

<212> DNA

<213> mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: Humán fibroblaszt könyvtár próba, 7-es exon, beleértve az amplifikációs primereket

<400> 1

```
ctgggctgta gctatgataa accggcagga gattggtgga cctcgtcttt ataccatcgc 60
agttgcttcc ctgggttaaag gaggggcctg taatcctgcc tgcttcatca cacagctcct 120
ccctgtgaaa aggaagctag gggttctatga atggacttca aggttaagaa gtcacataaa 180
tcccacaggc actgttttgc ttcagctaga                                210
```

<210> 2

<211> 268

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: a cDNS klón 5' vége, beleértve az amplifikációs primereket

<400> 2

```
attggtccgc ccctgaggtt aatcttaaaa gccaggtta cccgcggaaa tttatgctgt 60
ccggtcaccg tgacaatgca gctgaggaac ccagaactac atctgggctg cgcgcttgcg 120
cttcgcttcc tggccctcgt ttcttgggac atccctgggg ctagagcact ggacaatgga 180
ttggcaagga cgcctaccat gggctggctg cactggggagc gcttcatgtg caaccttgac 240
tgccaggaag agccagattc ctgcatca                                268
```

<210> 3

<211> 1343

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 3

```
ccgcgggaaa tttatgctgt ccggtcaccg tgacaatgca gctgaggaac ccagaactac 60
atctgggctg cgcgcttgcg cttcgttcc tggccctcgt ttcttgggac atccctgggg 120
ctagagcact ggacaatgga ttggcaagga cgcctaccat gggctggctg cactggggagc 180
gcttcatgtg caaccttgac tgccaggaag agccagattc ctgcatcagt gagaagctct 240
tcatggagat ggcagagctc atggtctcag aaggctggaa ggatgcaggt tatgagtacc 300
totgcattga tgactgttgg atggctcccc aaagagattc agaaggcaga cttcaggcag 360
accctcagcg ctttctcat gggattcgcc agctagctaa ttatgttcac agcaaaggac 420
tgaagctagg gatttatgca gatgttgaa ataaaacctg cgcaggcttc cctgggagtt 480
ttggatacta cgacattgat gccagacct ttgctgactg gggagtagat ctgctaaaat 540
ttgatggttg ttactgtgac agtttgaaa atttggcaga tggttataag cacatgtcct 600
tggccctgaa taggactggc agaagcattg tgtactcctg tgagtggcct ctttatatgt 660
ggccctttca aaagcccaat tatacagaaa tccgacagta ctgcaatcac tggcgaaatt 720
```



ttgctgacat tgatgattcc tggaaaagta taaagagtat cttggactgg acatctttta 780
 accaggagag aattgttgat gttgctggac cagggggttg gaatgaccca gatatgttag 840
 tgattggcaa ctttggcctc agctggaatc agcaagtaac tcagatggcc ctctgggcta 900
 tcatggctgc tcctttattc atgtctaata acctccgaca catcagccct caagccaaag 960
 ctctccttca ggataaggac gtaattgcca tcaatcagga ccccttgggc aagcaagggt1020
 accagcttag acaggagac aactttgaag tgtgggaacg acctctctca ggcttagcct1080
 gggctgtagc tatgataaac cggcaggaga ttgggtggacc tcgctcttat accatcgcag1140
 ttgcttcctt gggtaaagga gtggcctgta atcctgcctg cttcatcaca cagctcctcc1200
 ctgtgaaaag gaagctaggg ttctatgaat ggacttcaag gttaagaagt cacataaatc1260
 ccacaggcac tgttttgctt cagctagaaa atacaatgca gatgtcatta aaagacttac1320
 tttaaaaaaa aaaaaaactc gag 1343

<210> 4

<211> 398

<212> FEHÉRJE

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu	Asp	Asn	Gly	Leu	Ala	Arg	Thr	Pro	Thr	Met	Gly	Trp	Leu	His	Trp
1				5						10				15	
Glu	Arg	Phe	Met	Cys	Asn	Leu	Asp	Cys	Gln	Glu	Glu	Pro	Asp	Ser	Cys
			20					25					30		
Ile	Ser	Glu	Lys	Leu	Phe	Met	Glu	Met	Ala	Glu	Leu	Met	Val	Ser	Glu
			35					40					45		
Gly	Trp	Lys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Leu	Cys	Ile	Asp	Asp	Cys	Trp
		50				55					60				
Met	Ala	Pro	Gln	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Pro	Gln
65					70					75				80	
Arg	Phe	Pro	His	Gly	Ile	Arg	Gln	Leu	Ala	Asn	Tyr	Val	His	Ser	Lys
				85					90					95	
Gly	Leu	Lys	Leu	Gly	Ile	Tyr	Ala	Asp	Val	Gly	Asn	Lys	Thr	Cys	Ala
			100					105					110		
Gly	Phe	Pro	Gly	Ser	Phe	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Gln	Thr	Phe
			115					120					125		



Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp		
130	135	140
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu		
145	150	155 160
Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr		
	165	170 175
Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys		
	180	185 190
Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile		
	195	200 205
Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp		
	210	215 220
Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly		
225	230	235 240
Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp		
	245	250 255
Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile		
	260	265 270
Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile		
	275	280 285
Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp		
	290	295 300
Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val		
305	310	315 320
Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile		
	325	330 335
Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe		
	340	345 350



Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp
 355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu
 370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 385 390 395

<210> 5

<211> 1197

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

ctggacaatg gattggcaag gacgcctacc atgggctggc tgcactggga gcgcttcatg 60
tgcaaccttg actgccagga agagccagat tcctgcatca gtgagaagct cttcatggag 120
atggcagagc tcatggtctc agaaggctgg aaggatgcag gttatgagta cctctgcatt 180
gatgactggt ggatggctcc ccaaagagat tcagaaggca gacttcaggc agaccctcag 240
cgctttcctc atgggattcg ccagctagct aattatgttc acagcaaagg actgaagcta 300
gggatttatg cagatgttgg aaataaaacc tgcgcaggct tccctgggag ttttggatac 360
tacgacattg atgccagac ctttgctgac tggggagtag atctgctaaa atttgatggg 420
tgttactgtg acagtttgga aaatttggca gatggttata agcacatgtc cttggccctg 480
aataggactg gcagaagcat tgtgtactcc tgtgagtggc ctctttatat gtggcccttt 540
caaaagccca attatacaga aatccgacag tactgcaatc actggcgaaa ttttgctgac 600
attgatgatt cctggaaaag tataaagagt atcttgact ggacatcttt taaccaggag 660
agaattgttg atgttgctgg accagggggg tggaatgacc cagatatgtt agtgattggc 720
aactttggcc tcagctggaa tcagcaagta actcagatgg ccctctgggc tatcatggct 780
gctcctttat tcatgtctaa tgacctccga cacatcagcc ctcaagccaa agctctcctt 840
caggataagg acgtaattgc catcaatcag gacccttg gcaagcaagg gtaccagctt 900
agacagggag acaactttga agtgtgggaa cgacctctct caggcttagc ctgggctgta 960
gctatgataa accggcagga gattggtgga cctcgctctt ataccatcgc agttgcttcc1020
ctgggtaaaag gagtggcctg taatcctgcc tgcttcatca cacagctcct ccctgtgaaa1080
aggaagctag ggttctatga atggacttca aggttaagaa gtcacataaa tcccacaggc1140
actgttttgc ttcagctaga aaatacaatg cagatgtcat taaaagactt actttaa 1197

```

<210> 6

<211> 22

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 6

ctgggctgta gctatgataa ac

22

<210> 7

<211> 21

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 7

tctagctgaa gcaaaacagt g

21

<210> 8

<211> 19

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 8

attggtccgc ccctgaggt

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 9

tgatgcagga atctggctct

20

<210> 10

<211> 35

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 10

ttttggatcc ctcgaggaca ttgattattg actag

35

<210> 11

<211> 28

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 11

ttttggatcc cgtgtcaagg acggtgac

28

<210> 12

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

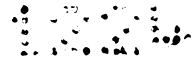
<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 12

ttttggatcc accatggcta

20

<210> 13



<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 13

ttttgccggc actgccctct tgaa

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 14

ttttcagctg gacaatggat tggc

24

<210> 15

<211> 20

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 15

ttttgctagc tggcgaatcc

20

<210> 16

<211> 30

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>



<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 16

ttttggatcc gtgtcccata gtgtttccaa

30

<210> 17

<211> 28

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 17

ttttggatcc gcagtcgtgg ccagtacc

28

<210> 18

<211> 12

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: inszerció oligonukleotid

<400> 18

ctagtcctag ga

12

<210> 19

<211> 22

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: PCR Primer

<400> 19

ttttgagcac agagcctcgc ct

22

<210> 20

<211> 30

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: részleges kollagén promoter

<400> 20

ttttggatcc ggtgagctgc gagaatagcc

30

<210> 21

<211> 76

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: részleges kollagén promoter

<400> 21

gggccccag cccagccct ccattggtg gaggccttt tggaggcacc ctagggccag 60
gaaacttttg ccgtat

76

<210> 22

<211> 69

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: részleges kollagén promoter

<400> 22



aaatagggca gatccgggct ttattatattt agcaccacgg ccgccgagac cgcgtccgcc 60
ccgcgagca 69

<210> 23

<211> 86

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása: részleges kollagén promoter

<400> 23

tgccctattt atacggcaaa agtttcctgg ccctaggggtg cctccaaaag ggcctccacc 60
aatgggaggg ctggggctgg gggccc 86

<210> 24

<211> 55

<212> DNS

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> A mesterséges szekvencia leírása:PCR Primer

<400> 24

cgcggggcgg acgcggtctc ggcggccgtg gtgctaaaat aataaagccc ggatc 55



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Humán alfa-galaktozidáz A készítmény, amiben az említett készítmény össz-glikánjának több mint 50%-a komplex-típusú glikán.

2. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein, amely készítményt SDS-PAGE-val vagy fordított fázisú HPLC-vel mérve legalább 98%-os homogenitásig tisztítunk.

3. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein, amely készítmény specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje.

4. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely készítményt SDS-PAGE-val vagy fordított fázisú HPLC-vel mérve legalább 98%-os homogenitásig tisztítunk, és specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje.

5. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely említett készítményben az össz-glikántartalomnak legalább 67%-a komplex típusú glikán.

6. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely említett készítmény átlagosan két komplex típusú glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A monomerre számítva.

7. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely említett készítményben az alfa-



galaktozidáz A glikoformák össz-glikántartalmának több mint 50%-a szialilezve van.

8. Az 1. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, aholis az alfa-galaktozidáz A-t alfa-galaktozidáz A/emlős expressziós vektor konstrukcióval transzfektált humán sejtekből izoláljuk.

9. A 8. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amiben a transzfektált humán sejtek szekunder fibroblasztok.

10. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amiben az alfa-galaktozidáz A glikoformák körülbelül 50-70%-ban 2-4 szíalsav csoportot tartalmazó komplex glikánokat tartalmaznak.

11. Egy humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítményt tartalmazó kiserelési forma, amely készítményt SDS-PAGE-val vagy fordított fázisú HPLC-vel mérve legalább 98%-os homogenitásig tisztítunk, és specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és az említett készítmény a poszt-transzlációsan módosított, érett humán alfa-galaktozidáz A fehérje egy vagy több glikoformáját tartalmazza, és az alfa-galaktozidáz A-t alfa-galaktozidáz A/emlős expressziós vektor konstrukcióval transzfektált humán sejtekből izoláljuk.

12. A 11. igénypont szerinti készítmény, amiben a transzfektált humán sejtek szekunder fibroblasztok.

13. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivi-

tása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és úgy állítottuk elő, hogy az alfa-galaktozidáz A glikoformákat hidrofób kölcsönhatású gyantán elválasztjuk a többi komponenstől, és a készítmény több mint 50%-ban komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva.

14. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva, amit úgy állítunk elő, hogy egy mintában az alfa-galaktozidáz A glikoformákat a többi komponenstől a következő csoportba tartozó tisztítási eljárással választjuk el: kromatofókusáló kromatográfia, fémkelát affinitás kromatográfia és immunaffinitás kromatográfia.

15. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva, amit az alábbi lépések alkalmazásával állítunk elő:

- a) az alfa-galaktozidáz A glikoformákat savas pH-n egyensúlyba hozó pufferben kationcserélő gyantára kötjük,

- b) a gyantát az egyensúlyba hozó pufferrel mossuk, hogy eluáljuk a megkötetlen anyagot, és
- c) az alfa-galaktozidáz A glikoformákat eluáló oldattal eluáljuk, amit az alábbi csoportból választunk ki: 10-100 mmol/l sóoldat, pH=4-5-re pufferelt sóoldat és ezek kombinációja.

16. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, megnövekedett oligoszacharid töltéssel, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva és specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és az említett készítmény legalább 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva, és az említett készítményt az alábbi lépések alkalmazásával állítjuk elő:

- a) egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe egy szialil-transzferázt kódoló polinukleotidot juttatunk be, vagy homológ rekombinációval egy szabályozó-szekvenciát juttatunk be, ami egy endogén szialil transzferáz expresszióját szabályozza;
- b) az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet olyan körülmények között tenyésztjük, ami az alfa-galaktozidáz A és a szialil-transzferáz expresszióját eredményezik; és
- c) izoláljuk az alfa-galaktozidáz A fehérjét, amely alfa-galaktozidáz A fehérjének a polinukleotidot nem tartalmazó sejtben előállított alfa-galaktozidáz A-val összehasonlítva megnőtt az oligoszacharid töltése.

17. A 16. igénypont szerinti készítmény, aminek előállításához azt a lépést is alkalmazzuk, amiben a megnőtt molekulasúlyú, töltésű az alfa-galaktozidáz A glikoformákat a c) lépésben kapott alfa-galaktozidáz A fehérje frakcionálásával vagy tisztításával szelektáljuk.

18. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, megnőtt foszforilezettséggel, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva és az említett készítményt az alábbi lépések alkalmazásával állítjuk elő:

- a) egy alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtbe egy foszforil-transzferázt kódoló polinukleotidot juttatunk be, vagy homológ rekombinációval egy szabályozó-szekvenciát juttatunk be, ami egy endogén foszforil transzferáz expresszióját szabályozza;
- b) az alfa-galaktozidáz A-t termelő sejtet olyan körülmények között tenyésztjük, ami az alfa-galaktozidáz A és a foszforil-transzferáz expresszióját eredményezik; és
- c) izoláljuk az alfa-galaktozidáz A fehérjét, amely alfa-galaktozidáz A fehérjének a polinukleotidot nem tartalmazó sejtben előállított alfa-galaktozidáz A-val összehasonlítva megnőtt a foszforilezettsége.

19. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, az oligoszacharid láncokon csökkent számú terminális szíálsav és galaktóz egységgel, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva és az említett készítményt az alábbi lépések alkalmazásával állítjuk elő:

a) az alfa-galaktozidáz A fehérjét neuraminidázzal hozzuk érintkezésbe, hogy eltávolítsuk a szíálsav csoportokat, ami a terminális galaktóz egységek exponálódását eredményezi,

b) az a) lépésben kapott, deszialilezett alfa-galaktozidáz A fehérjét β -galaktozidázzal kezeljük, hogy eltávolítsuk az exponálódott, terminális galaktóz egységeket; és

aholis a b) lépésben kapott, deszialilezett, degalaktozilezett alfa-galaktozidáz A fehérje csökkent számú terminális szíálsav vagy galaktóz egységet tartalmaz az oligoszacharid láncon, egy olyan alfa-galaktozidáz A fehérjével összehasonlítva, amit nem hoztunk érintkezésbe neuraminidázzal és β -galaktozidázzal.

20. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, az oligoszacharid láncokon csökkent számú terminális galaktóz egységgel, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva és az említett készítményt úgy állítjuk elő,



hogy az alfa-galaktozidáz A fehérjét β -galaktozidázzal hozzuk érintkezésbe, hogy eltávolítsuk a terminális galaktóz egységeket, és a degalaktozilezett alfa-galaktozidáz A fehérje kisebb számú terminális galaktóz egységet tartalmaz az oligoszacharid láncokon, egy olyan alfa-galaktozidáz A fehérjével összehasonlítva, amit nem hoztunk érintkezésbe β -galaktozidázzal.

21. Készítmény, ami egy vagy több érett, poszt-transzlációsan módosított humán alfa-galaktozidáz A glikoformát tartalmaz, legalább 98%-os homogenitásig tisztítva, specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje, és a készítmény több mint 50% komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A glikoformára számítva, kovalens kötással polietilén-glikolhoz (PEG) kapcsolva, aholis a PEG kovalens kötással van konjugálva az alfa-galaktozidáz A glikoformák egy vagy több pontjához, amiket az alábbi csoportból választhatunk ki: aminocsoportok, karboxilcsoportok, szulfhidrilcsoportok és szénhidrát csoportok.

22. Humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amit az alábbi eljárással állítunk elő:

- a) biztosítunk egy humán sejtet, amit genetikailag módosítottunk, hogy egy alfa-galaktozidáz A polipeptidet expresszáljon; és
- b) a humán sejtből vagy a humán sejt tenyésztő közegéből tisztítjuk az alfa-galaktozidáz A polipeptidet.

23. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely készítményt SDS-PAGE-val vagy

fordított fázisú HPLC-vel mérve legalább 98%-os homogenitásig tisztítunk.

24. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely készítménynek a specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje.

25. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely készítményt SDS-PAGE-val vagy fordított fázisú HPLC-vel mérve legalább 98%-os homogenitásig tisztítunk, és specifikus aktivitása legalább $2,0 \times 10^6$ egység/mg fehérje.

26. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amiben az összes glikánnak legalább a 67%-a komplex típusú glikán.

27. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, ami átlagosan két komplex glikán láncot tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A monomerre számítva.

28. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amiben az alfa-galaktozidáz A glikoformák össz-glikánjának több mint 50%-a szialilezve van.

29. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, aholis a genetikailag módosított humán sejtet egy alfa-galaktozidáz A/endlős expressziós vektor konstrukcióval transzfektáljuk.

30. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, aholis a genetikailag módosított humán sejtet egy olyan szabályozó elemet kódoló nukleinsavval transz-

fektálunk, ami az alfa-galaktozidáz A egy kódoló szekvenciájának expresszióját szabályozza.

31. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amiben a genetikailag módosított humán sejtek szekunder fibroblasztok.

32. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely alfa-galaktozidáz A polipeptid tisztítása legalább egy tisztítási eljárást foglal magában, amit az alábbiak közül választhatunk ki: hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, ionos kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, kromatofókuszáló kromatográfia, fémkelát kromatográfia és affinitáskromatográfia.

33. A 32. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, amely alfa-galaktozidáz A polipeptid tisztítása magában foglalja még az alfa-galaktozidáz A glikoforma frakcionálásának lépését is.

34. A 22. igénypont szerinti humán alfa-galaktozidáz A glikoprotein készítmény, aholis az eljárás magában foglalja a szialil transzferáz humán sejtben való expressziójának lépését is.

35. A 18. igénypont szerinti készítmény, amiben a készítmény össz-glikántartalmának legalább 67%-a komplex típusú glikán.

36. A 18. igénypont szerinti készítmény, amiben átlagosan két komplex glikán jut egy alfa-galaktozidáz A monomerre.

37. A 19. igénypont szerinti készítmény, amiben a készítmény össz-glikán tartalmának legalább 67%-a komplex típusú glikán.

38. A 19. igénypont szerinti készítmény, amiben átlagosan két komplex glikán jut egy alfa-galaktozidáz A monomerre.

39. A 20. igénypont szerinti készítmény, amiben a készítmény össz-glikán tartalmának legalább 67%-a komplex típusú glikán.

40. A 20. igénypont szerinti készítmény, amiben átlagosan két komplex glikán jut egy alfa-galaktozidáz A monomerre.

41. A 21. igénypont szerinti készítmény, amiben a készítmény össz-glikán tartalmának legalább 67%-a komplex típusú glikán.

42. A 21. igénypont szerinti készítmény, amiben átlagosan két komplex glikán jut egy alfa-galaktozidáz A monomerre.

43. Eljárás alfa-galaktozidáz A készítmény előállítására, amiben az össz-glikán tartalomnak több mint 50%-a komplex típusú glikán, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- a) biztosítunk egy humán sejtet, amit genetikailag módosítottunk, hogy egy alfa-galaktozidáz A polipeptidet expresszáljon; és

- b) a humán sejtől vagy a humán sejt tenyésztő közegéből tisztítjuk az alfa-galaktozidáz A polipeptidet.

44. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a genetikailag módosított humán sejteket egy alfa-galaktozidáz A/emplős expressziós vektor konstrukcióval transzfektáljuk.

45. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a genetikailag módosított humán sejtet egy olyan nukleinsavval transzfektáljuk, ami az alfa-galaktozidáz A-t kódoló szekvencia expresszióját szabályozó elemet kódol.

46. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a genetikailag módosított humán sejtek szekunder fibroblasztok.

47. A 43. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alfa-galaktozidáz A polipeptid tisztítási eljárása legalább egyet tartalmaz az alábbi csoportba tartozó tisztítási lépésekből: hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, ioncserés kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia, kromatofókuszálási kromatográfia, fémkelát kromatográfia és affinitáskromatográfia.

48. A 47. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alfa-galaktozidáz A polipeptid tisztítása magában foglalja még egy alfa-galaktozidáz A glikoforma frakcionálási lépését is.

49. Gyógyászati készítmény, ami olyan alfa-galaktozidáz A készítményt tartalmaz, amiben az össz-glikán tartalomnak több mint 50%-a komplex-típusú glikán.

50. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amiben az össz-glikán tartalomnak legalább 67%-a komplex típusú glikán.



51. Az 1. igénypont szerinti készítmény, amiben az alfa-galaktozidáz A készítmény átlagosan két komplex glikánt tartalmaz egy alfa-galaktozidáz A monomerre számítva.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

1367 10 = 196 doll


2002.02.28.

1. ábra

CTGGGCTGTAGCTATGATAAAACCGGCAGGA
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCA
GTTGCTTCCTGGGTAAAGGAAGTGGCCTGTA
ATCCTGCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGOTTCTATGAATGGA
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCAC
AGGCACTGTTTTCCTTCAGCTAGA

2. ábra

ATTGGTCCGCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC

CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC

CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCT

TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC

CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NcoI

GCAAGGACGCTACCATGGGCTGGCTGCAC

TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC

AGGAAGAGCCAGATTCTGCATCA

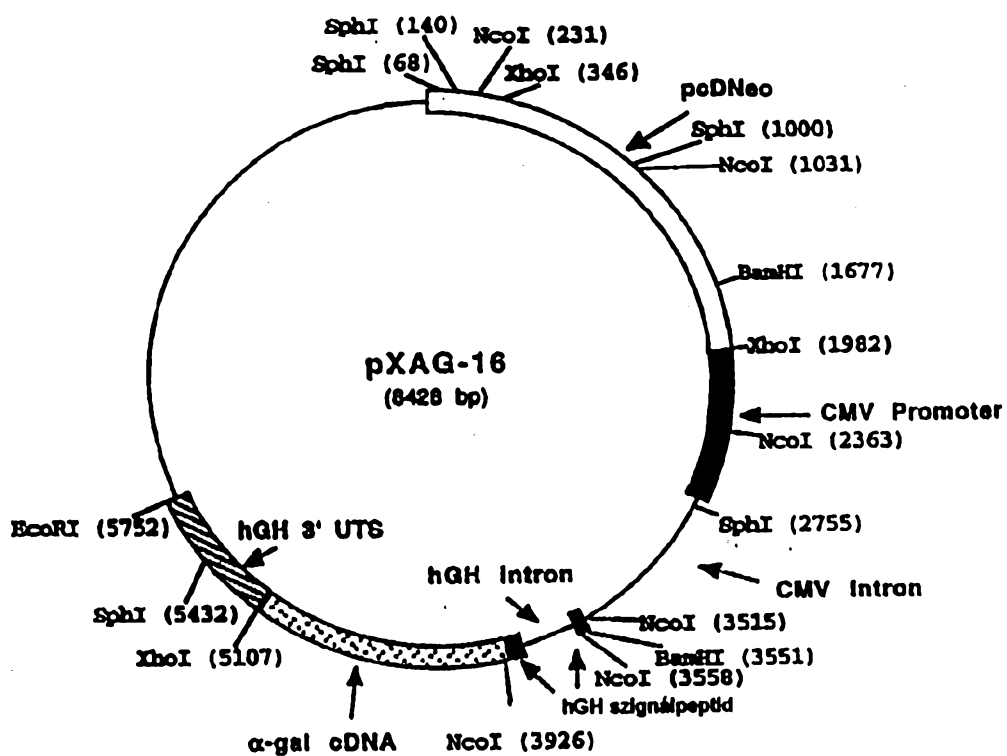
3. ábra

```

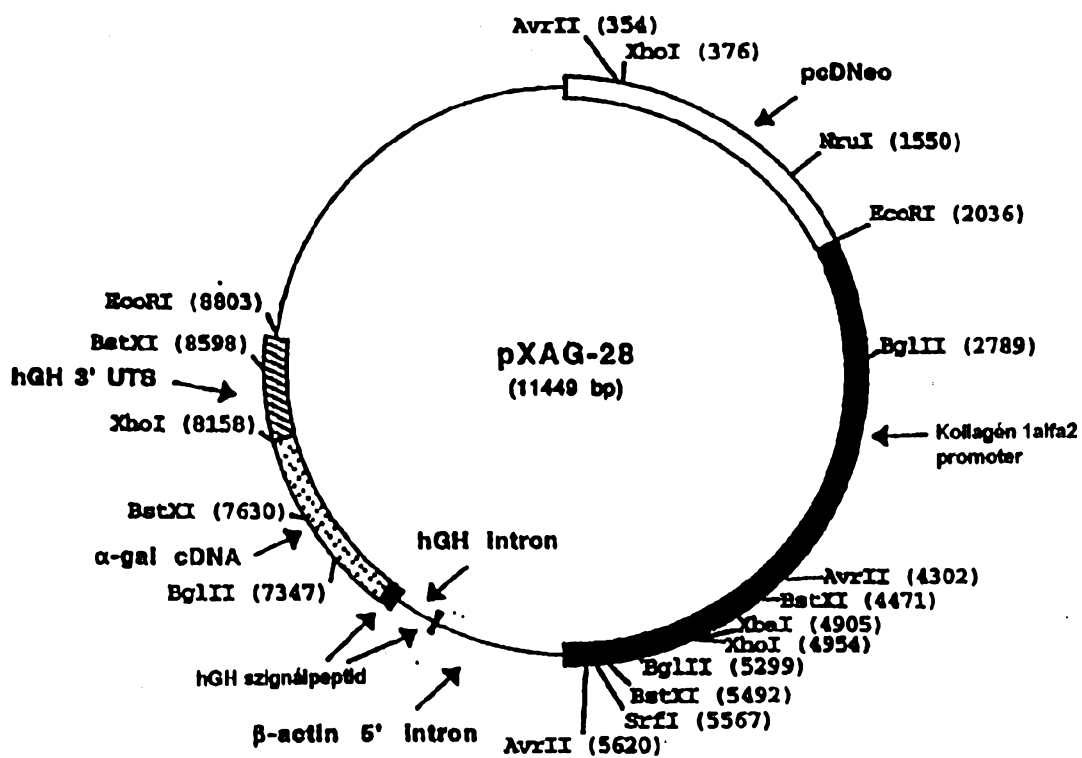
1  CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC
61  ATCTGGGCTG CCGGCTTGCG CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCTGGGGAC ATCCCTGGGG
121 CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC
181 GCTTCATGTG CAACTTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT
241 TCAAGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC
301 TCTGCATTGA TGA CTGTTGG ATGGCTCCCG AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG
361 ACCCTCAGCG CTTTCTCAT GGGATTGGC AGCTAGCTAA TTATGTTTAC AGCAAGGAC
421 TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT
481 TTGGATACTA CGACATTGAT GGCAGAGCT TTGCTGACTG GCGAGTAGAT CTGCTAAAAT
541 TTGATGGTTG TTA CTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT
601 TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCTTG TGAATGGCCT CTTTATATGT
661 GGGCCCTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT
721 TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA
781 ACCAGGAGAG AATGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG
841 TGATTGGCAA CTTGGGCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAC TCAGATGGCC CTCGGGCTA
901 TCATGGCTGC TCTTTATTC ATGTCTAATG AGCTGGACA CATCAGCCCT CAGCCCAAG
961 CTCTCTTCA GGATAAGGC GTAATTGCA TCAATCAGGA CCCCTTGGC AAGCAAGGT
1021 ACCAGCTTAG ACAGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT
1081 GGGCTGTAC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TGGCTCTTAT ACCATGCGAG
1141 TTGCTTCCTT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCTGCGCTG CTTTCATCACA CAGCTCCTCC
1201 CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGACTTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC
1261 CCACAGGCAC TGTTTTCTT CAGCTAGAAA ATACATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC
1321 TTTAAAAAAA AAAAAACTC GAG

```

4. ábra



5. ábra



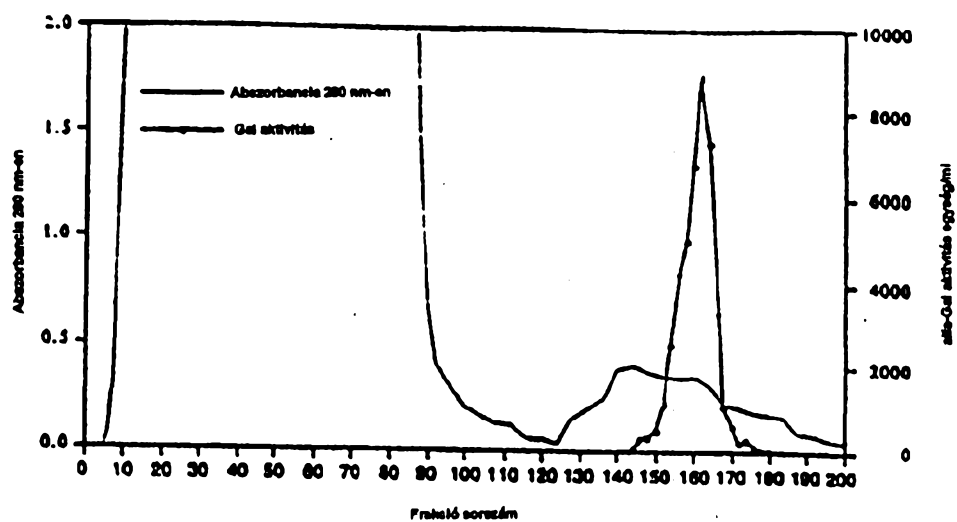
1226/10

[illegible]

7. ábra

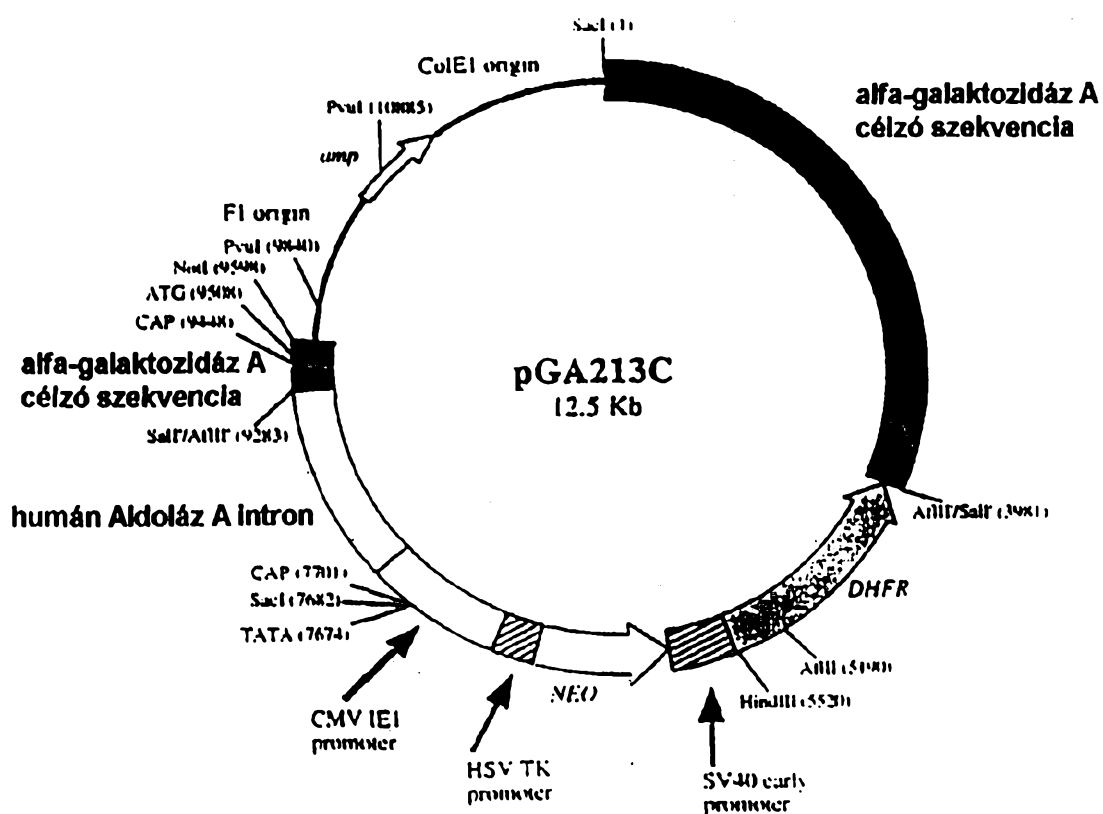
1 CTGGAACAATG GATTGOCAGG GACGCTAGC ATGCGCTGCG TCGACTGCGA GCGCTTCATG
 61 TGCAACCTTG ACTGOCAGCA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAAGCT CTTGATGAG
 121 ATGOCAGAGC TCATGCTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAO GTTATGAGTA CCTCTGACTT
 181 GATGACTGTT GATGCGCTCC CCAAGGAGAT TCAGAAAGCA GACTTCAAGC AGAGGCTCAO
 241 CGCTTCTCTC ATGCGATTGG CCACTAGCT AATTATGTTT ACAAGCAAGG ACTGAAAGCTA
 301 GCGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAGCC TCGGCAAGCT TCCTGCGAG TTTTGGATAC
 361 TACGACATTG ATGCGCAGAC CTTTCTGAC TCGGAGTAAO ATCTGCTAAA ATTTGATGTT
 421 TTTTACTGTO ACAATTTGGA AAATTTGCA GATGTTTATA AGCAGATGTC CTTGCGCTG
 481 AATAAGACTG CAGAAAGCAT TGTGACTCC TGTGAGTGGC CTCCTTTATAT GTGCGCTTT
 541 CAAAAGCCCA ATTATACAGG AATCGAGCAO TACTGCAATC ACTGCGGAAA TTTTCTGAC
 601 ATTGATGATT CCGGAAAAO TATAAGAGT ATCTTGGACT GAGATCTTT TAAGCAGAG
 661 AGAATTTTG ATGTTCTGCG AGCAGGCGGT TCGAATGAGC CAGATATGTT AGTGAATGGC
 721 AACTTTGCGC TCAGCTGGA TCAAGAGTA ACTCAGATGG CGCTCTGCGC TATCATGCT
 781 GCTGCTTTAT TCATGCTAA TGAAGTGGG CAGATCAAGC CTCAGGCAA AGCTCTGCTT
 841 CAGGATAAAG AGTAAATTC CATCAATCAO GAGCGCTTGG CCAAGCAAGG GTAGCAAGCTT
 901 AGACAGGAGG ACAACTTTGA AGTGTGGAO GAGCTCTCT CAGGCTTAAO CTGCGCTGTA
 961 GCTATGATAA AGCGGAGCA GATTGTTGA CCGCTCTT ATACCATGCG AGTCTCTTC
 1021 CTGCGTAAAG GAGTGGGCTG TAATGCTGCG TGCTTCATCA CAGAGCTGCT CGCTGTGAAA
 1081 AGAAGCTAG GTTCTATGA ATGAGTTCA AGTTAAAGG GTACATATA TCGCAGAGC
 1141 ACTGTTTTG TTCAAGTAA AAATACAATG CAGATGCTAT TAAAGAGCTT ACTTTAA

8. ábra



9. ábra

pGA213C alfa-galaktozidáz A génaktivációs konstrukció



10. ábra

A humán alfa-galaktozidáz A lókuszt aktiválása homológ rekombinációval

