



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 31 456 T2** 2007.08.23

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 332 206 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 31 456.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/31293**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 993 857.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/004616**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.11.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.01.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.08.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.08.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/24** (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

439923 **12.11.1999** **US**

(73) Patentinhaber:

BioMarin Pharmaceutical, Inc., Novato, Calif., US;
Los Angeles Biomedical Research Institute at
Harbor-UCLA Medical Center, Torrance, Calif., US

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183
Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR

(72) Erfinder:

HENSTRAND, John M., Novato, CA 94949, US;
QIN, Minmin, Novato, CA 94949, US; CHAN,
Wia-Pan, Navoto, CA 94949, US; CHEN, Lin,
Novato, CA 94949, US; FITZPATRICK, Paul A.,
Novato, CA 94949, US; WENDT, Dan J., Novato, CA
94949, US; ZECHERLE, Gary N., Novato, CA 94949,
US; STARR, Christopher M., Novato, CA 94949,
US; KAKKIS, Emil D., Nicasio, CA 94946, US;
TANAMACHI, Becky, Signal Hill, CA 90807, US

(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTE ALPHA-L-IDURONISASE, DEREN HERSTELLUNGS- UND AUFREINIGUNGS-
VERFAHREN, UND BEHANDLUNG VON DURCH DIESE HERVORGERUFENE MANGELERKRANKUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt im Gebiet der Molekularbiologie, Enzymologie, Biochemie und klinischen Medizin. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung eine humane rekombinante α -L-Iduronidase bereit, Verfahren zur Produktion und Reinigung von humanem rekombinantem α -L-Iduronidaseenzym in kommerzieller Qualität im Großmaßstab und Verfahren zur Behandlung bestimmter genetischer Erkrankungen, einschließlich α -L-Iduronidase-Defizienz und Mucopolysaccharidose I (MPS I).

Hintergrund der Erfindung

[0002] Kohlenhydrate spielen eine Anzahl wichtiger Rollen beim Funktionieren lebender Organismen. Zusätzlich zu ihren metabolischen Rollen sind Kohlenhydrate strukturelle Komponenten des menschlichen Körpers, die kovalent an zahlreiche andere Einheiten, wie etwa Proteine und Lipide, angeheftet sind (diese werden als Glykokonjugate bezeichnet). Beispielsweise umfassen menschliche Bindegewebe und Zellmembranen Proteine, Kohlenhydrate und eine Proteoglykan-Matrix. Der Kohlenhydratanteil dieser Proteoglykanmatrix liefert wichtige Eigenschaften für die Körperstruktur.

[0003] Eine genetische Defizienz für das Kohlenhydrat-spaltende lysosomale Enzym α -L-Iduronidase verursacht eine lysosomale Speicherkrankheit, die als Mucopolysaccharidose I (MPS I) bekannt ist (Neufeld und Muenzer, S. 1565–1587, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Herausgeber C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly und D. Valle, McGraw-Hill, New York (1989)). In einer schweren Form ist MPS I allgemein als Hurler-Syndrom bekannt und ist mit zahlreichen Problemen, wie etwa geistiger Retardierung, Hornhauttrübung, groben Gesichtszügen, Herzerkrankung, Atemerkrankung, Leber- und Milzvergrößerung, Hernien und Gelenksteifigkeit, verbunden. Patienten, die am Hurler-Syndrom leiden, sterben gewöhnlich, bevor sie ein Alter von 10 Jahren erreichen. Bei einer mittleren Form, die als Hurler-Scheie-Syndrom bekannt ist, ist die mentale Funktion im Allgemeinen nicht schwer beeinträchtigt, jedoch können physische Probleme im Teenager- oder Twen-Alter zum Tode führen. Das Scheie-Syndrom ist die mildeste Form von MPS I. Es ist mit einer normalen Lebensspanne kompatibel, jedoch verursachen Gelenksteifigkeit, Hornhauttrübung und Herzklappenerkrankung signifikante Probleme.

[0004] Gemäß einer British Columbia-Erhebung bei allen Neugeborenen wird die Häufigkeit von MPS I auf 1:100.000 geschätzt (Lowry et al., *Human Genetics* 85: 389–390 (1990)) und auf 1:70.000 gemäß einer irischen Studie (Nelson, *Human Genetics* 101: 355–358 (1990)). Es scheint keine ethnische Neigung für diese Erkrankung zu geben. Es ist wahrscheinlich, dass die Erkrankung weltweit unterdiagnostiziert ist, entweder, weil der Patient an einer Komplikation stirbt, bevor die Diagnose gestellt ist, oder weil die milderen Formen des Syndroms fälschlicherweise für Arthritis gehalten oder ganz verpasst werden. Eine effektive Durchmusterung von Neugeborenen auf MPS I würde wahrscheinlich einige zuvor nicht detektierte Patienten auffinden.

[0005] Mit Ausnahme einiger weniger Patienten, die sich für eine Knochenmarktransplantation qualifizieren, sind für alle MPS I-Patienten keine signifikanten Therapien verfügbar. Hobbs et al., *Lancet* 2: 709–712 (1981) beschrieben als erste, dass eine Knochenmarktransplantation zu einer erfolgreichen Behandlung eines Hurler-Patienten führte. Seitdem haben klinische Studien an mehreren Transplantationszentren eine Verbesserung der physischen Erkrankung und eine Verlangsamung oder Stabilisierung der Entwicklungsverschlechterung gezeigt, wenn eine frühe Anwendung erfolgt (Whitley et al., *Am. J. Med. Genet.* 46: 209–218 (1993); Velodi et al., *Arch. Dis. Child.* 76: 92–99 (1997); Peters et al., *Blood* 91: 2601–2608 (1998); Guffon et al., *J. Pediatrics* 133: 119–125 (1998)). Jedoch begrenzen die signifikante Morbidität und Mortalität und die Notwendigkeit eines passenden Donor-Knochenmarks die Nützlichkeit von Knochenmarktransplantaten. Eine alternative Therapie, die für alle betroffenen Patienten verfügbar ist, wäre ein wichtiger Durchbruch bei der Behandlung und Bewältigung dieser Erkrankung.

[0006] Die Enzyersatz-Therapie ist als potentielle Therapie für MPS I eingeschätzt worden, nachdem man entdeckt hatte, dass α -L-Iduronidase den enzymatischen Defekt bei Hurler-Zellen in Kultur korrigieren kann, jedoch ist die Entwicklung einer humanen Therapie bisher technisch nicht machbar gewesen. Bei dem korrigierenden Prozess wird das Enzym, das einen Mannose-6-Phosphatrest enthält, über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen und zu den Lysosomen transportiert, wo es die gelagerten Substrate, Heparansulfat und Dermatan-sulfat, abbaut. Die Anwendung dieser Therapie auf Menschen ist aufgrund inadäquater Quellen von α -L-Iduronidase in Geweben bislang noch nicht möglich gewesen.

[0007] Für eine α -L-Iduronidase-Enzymtherapie bei MPS I wurde eine rekombinante Quelle des Enzyms benötigt, um therapeutisch hinreichende Zufuhren des Enzyms zu erhalten. Die cDNA für das Enzym aus dem Hund ist 1991 kloniert worden (Stoltzfus et al., J. Biol. Chem., 267: 6570–6575 (1992), die des menschlichen Enzyms im gleichen Jahr (Scott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9695–9699 (1991), Moskowitz et al., FA-SEB J 6: A77 (1992)). Nach der Klonierung der cDNA für α -L-Iduronidase erlaubte die Produktion adäquater Mengen an rekombinanter α -L-Iduronidase die Untersuchung der Enzymersatz-Therapie bei der MPS I des Hundes (Kakkis et al., Protein Expr. Purif. 5: 225–232 (1994)). Enzymersatz-Studien im Hundemodell der MPS I zeigten, dass intravenös verabreichte rekombinante α -L-Iduronidase sich weit verteilte und den lysosomalen Speicher in vielen Geweben reduzierte (Shull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12937–12941 (1994); Kakkis et al., Biochem. Mol. Med. 58: 156–167 (1996)).

Kurze Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Zusammengefasst betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Massenproduktion von humaner rekombinanter α -L-Iduronidase in großen Mengen mit angemessener Reinheit, um eine Produktion im Großmaßstab für die langfristige Patientennutzung der Enzymtherapie zu ermöglichen. Bei einer breiten Ausführungsform umfasst das Verfahren den Schritt der Transfektion einer cDNA, die für die Gesamtheit oder einen Teil einer α -L-Iduronidase codiert, in eine für deren Expression geeignete Zelle. Bei einigen Ausführungsformen wird eine cDNA verwendet, die für eine vollständige α -L-Iduronidase codiert, bevorzugt für eine humane α -L-Iduronidase. Jedoch kann bei anderen Ausführungsformen eine cDNA verwendet werden, die für ein biologisch aktives Fragment oder eine Mutante hiervon codiert. Spezifisch können eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen vorgenommen werden, wobei die biologische Aktivität des Enzyms erhalten bleibt oder verstärkt wird. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen wird ein Expressionsvektor verwendet, um die cDNA für deren Expression in eine geeignete Zelle oder Zelllinie zu übertragen. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die cDNA in eine chinesische Hamster-Ovarialzelle transfiziert, um die Zelllinie 2.131 zu erzeugen. Bei wiederum anderen bevorzugten Ausführungsformen betrifft das Produktionsverfahren eines oder mehrere der folgenden Merkmale, die besonders hohe Produktionsniveaus gezeigt haben: (a) der pH der Zellwachstumskultur kann während des Produktionsprozesses auf etwa 6,5 bis 7,0 gesenkt werden, bevorzugt auf etwa 6,8 bis 7,0, (b) immerhin 2 bis 3,5 Kulturvolumina des Mediums können während jeder 24-stündigen Zeitspanne durch kontinuierliche Perfusion ausgetauscht werden, (c) die Sauerstoffsättigung kann auf etwa 40% optimiert werden, kann aber immerhin auch 80% betragen, (d) makroporöse Cellulose-Mikroträger und etwa 5% Serum in dem Medium zu Beginn können verwendet werden, um Zellmasse zu produzieren, gefolgt von einer schnellen Auswasch-Verschiebung hin zu proteinfreiem Produktionsmedium, (e) ein proteinfreies oder proteinarmes Medium, wie etwa ein JRH Bioscience PF-CHO-Produkt, kann optimiert werden, um zusätzliche Mengen von einem oder mehreren Inhaltsstoffen einzubeziehen, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus: Glutamat, Aspartat, Glycin, Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden, (f) eine gerührte Tank-Suspensionskultur kann in einem kontinuierlichen Prozess perfundiert werden, um Iduronidase zu erzeugen.

[0009] Bei bevorzugten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung eine rekombinante chinesische Hamster-Ovarialzelllinie, wie etwa die Zelllinie 2.131, die stabil und verlässlich Mengen an α -L-Iduronidase produziert, die es ermöglichen, das Enzym therapeutisch zu nutzen. Bei einigen bevorzugten Ausführungsformen kann die Zelllinie mehr als eine Kopie eines Expressionskonstrukts enthalten. Bei noch bevorzugteren Ausführungsformen exprimiert die Zelllinie rekombinante α -L-Iduronidase in Mengen von wenigstens 20 Mikrogramm pro 10^7 Zellen pro Tag.

[0010] Bei bevorzugten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung einen Expressionsvektor, der ein Cytomegalievirus-Promotor/Enhancer-Element, ein 5'-Intron, bestehend aus einem murinen Ca-Intron, eine cDNA, die die Gesamtheit oder ein Fragment oder eine Mutante einer α -L-Iduronidase codiert, und eine 3'-Rinder-Wachstumshormon-Polyadenylierungsstelle umfasst. Außerdem ist die cDNA, die für die Gesamtheit oder ein Fragment oder eine Mutante einer α -L-Iduronidase codiert, bevorzugt etwa 2,2 kb lang. Dieser Expressionsvektor kann z.B. mit einem 50:1-Verhältnis mit jedem beliebigen gebräuchlichen Selektionsvektor, wie etwa pSV2NEO, transfiziert werden, um Insertionen von Mehrfachkopien zu verstärken. Alternativ kann Genamplifikation dazu verwendet werden, um Insertionen mehrfacher Kopien zu induzieren.

[0011] Die spezifische Aktivität der α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung beträgt über 200.000 Units pro Milligramm Protein. Bevorzugt beträgt sie mehr als etwa 240.000 Units pro Milligramm Protein. Das Molekulargewicht der α -L-Iduronidase der vorliegenden Erfindung beträgt etwa 82.000 Dalton, wovon etwa 70.000 Dalton Aminosäure sind und etwa 12.000 Dalton auf Kohlenhydrate entfallen.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Reinigung von α -L-Iduronidase. Gemäß einer ersten Ausführungsform kann eine Zellmasse in einem etwa 5% Serum enthaltenden Medium herangezogen werden, gefolgt vom Wechsel zu einem modifizierten proteinfreien Produktionsmedium ohne irgendeine signifikante Anpassung zur Herstellung eines Ausgangsmaterials hochspezifischer Aktivität für die Reinigung. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann eine Dreischritt-Säulen-Chromatographie verwendet werden, um das Enzym zu reinigen. Eine solche Dreischritt-Säulenchromatographie kann die Verwendung einer blauen Sepharose FF-Chromatographie, einer Cu^{2+} chelierenden Sepharose-Chromatographie und einer Phenyl-Sepharose-HP-Chromatographie beinhalten. Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein saurer pH-Behandlungsschritt verwendet, um potentielle Viren zu inaktivieren, ohne das Enzym zu schädigen. Concanavalin A-Sepharose-, Heparin-Sepharose- und Sephacryl 200-Säulen werden entfernt, und Blaue Sepharose- und Kupfer chelierende Säulen werden hinzugefügt, um die Kapazität des im Großmaßstab erfolgenden Reinigungsprozesses zu erhöhen, um unerwünschte Auswaschungen zu reduzieren, die für eine langfristige Patientennutzung unangemessen sind, und um die Reinheit des Produkts zu verbessern.

[0013] Bei einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Reinigen eines rekombinanten α -L-Iduronidaseenzym oder biologisch aktiver Fragmente oder einer Mutante davon auf eine Reinheit von gleich oder größer als etwa 99%, welches die folgenden Stufen umfasst:

- (a) Ernten und Filtrieren einer Flüssigkeit, erhalten aus einer Kultur von Zellen, die mit Nukleinsäuren, die die rekombinante α -L-Iduronidase codieren, transformiert wurden,
- (b) Einstellen des pH-Werts der Flüssigkeit auf einen sauren pH-Wert, gefolgt von Filtration durch einen 0,2 Mikrometer- bis 0,54 Mikrometer-Filter,
- (c) Leiten der Flüssigkeit durch eine blaue Sepharose-FF-Säule, um die rekombinante α -L-Iduronidase einzufangen,
- (d) Leiten des Eluats durch eine Kupfer chelierende Sepharosesäule, um kontaminierende Proteine zu entfernen,
- (e) Leiten des Eluats durch eine Phenyl-Sepharosesäule, um verbleibenden herausgelösten Cibacron Blau-Farbstoff und von vorherigen Säulen übertragene Kupferionen zu reduzieren, und
- (f) Konzentrieren und Diafiltrieren der daraus eluierten, gereinigten rekombinanten α -L-Iduronidase.

[0014] Bevorzugt wird die blaue Sepharose-FF-Säule verwendet, um die rekombinante α -L-Iduronidase sieben- bis zehnfach zu reinigen.

[0015] Bevorzugt umfasst das Verfahren die Verwendung von 10% Glycerol in allen Puffern, um die mengenmäßige Gewinnung der α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon zu steigern.

[0016] Bevorzugt wird die Stufe der Kupfer chelierenden Sepharose auf einer Kupfer chelierenden Sepharose-FF-Matrix ausgeführt.

[0017] Bevorzugt wird die Stufe der Phenyl-Sepharosesäule auf einer Phenyl-Sepharose-Hochleistungschromatographiematrix ausgeführt.

[0018] Bevorzugt besitzt die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon eine spezifische Aktivität von mehr als 240.000 Einheiten (Units) pro Milligramm Protein.

[0019] Bevorzugt umfasst die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon einen oder mehrere Mannose-6-phosphat-Reste.

[0020] Bevorzugt umfasst die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon einen an Position 3 angebundenen Mannose-6-phosphat-Rest und einen an Position 6 angebundenen Mannose-6-phosphat-Rest.

[0021] Bevorzugt besitzt die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon innerhalb einer Zelle eine Halbwertszeit von etwa 5 Tagen.

[0022] Bevorzugt ist die Kultur von Zellen eine Kultur von CHO-Zellen. Bevorzugt ist die Kultur von CHO-Zellen eine Kultur von CHO-Zellen der Zelllinie 2.131.

[0023] Bevorzugt werden die Zellen in einem proteinfreien Kulturmedium mit einem pH-Wert zwischen 6,8 und 7,0 kultiviert, wobei das Medium mit 7,6 mg/l Thymidin, 13,6 mg/l Hypoxanthin, 375 $\mu\text{g/ml}$ G418 und 5% fötalem Rinderserum supplementiert ist.

- [0024]** Bevorzugt werden die Zellen bis zur Konfluenz mit einer Dichte zwischen $2,0 \times 10^5$ bis $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml gezüchtet.
- [0025]** Bevorzugt wird das Medium der Zellen bei Konfluenz durch kontinuierliche Perfusion geerntet.
- [0026]** Bevorzugt umfasst die kontinuierliche Perfusion das Austauschen von zwischen 2 bis 3,5 Kulturvolumina des Mediums über 24 Stunden.
- [0027]** Bevorzugt wird die Erzeugung der rekombinanten α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon durch Ergänzen des Mediums mit Natriumbutyrat für 12 Stunden zum Induzieren der Genexpression von α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon gefördert.
- [0028]** Bevorzugt wird das Natriumbutyrat 12 Stunden nach der ersten Induktion mit Natriumbutyrat aus dem Medium entfernt.
- [0029]** Bevorzugt wird die Erzeugung der rekombinanten α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon während eines 21-tägigen Zeitraums der Proteinerzeugung mit Natriumbutyrat alle 48 Stunden erneut induziert.
- [0030]** Bevorzugt wird die rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon die Aminosäuresequenz der Reste 26 bis 653 von SEQ ID NO: 2 umfassen.
- [0031]** Bevorzugt ist die rekombinante α -L-Iduronidase eine menschliche α -L-Iduronidase der SEQ ID NO: 2.

Beschreibung der Figuren

- [0032]** [Fig. 1](#) stellt die Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von cDNA dar, die für α -L-Iduronidase codiert (SEQ ID NO: 1 und 2). Es werden die Nukleotide 1 bis 6200 angegeben. Die Aminosäuren werden ausgehend vom ersten Methionin im offenen Leseraster angegeben.
- [0033]** [Fig. 2](#) stellt die Ergebnisse von SDS-PAGE-Läufen von Eluat dar, erhalten gemäß den Prozeduren wie unten beschrieben. Die obere Tafel zeigt die SDS-PAGE-Ergebnisse von gereinigter α -L-Iduronidase (3 Mikrogramm) und Verunreinigungen aus dem Produktions-/Reinigungs-Schema, wie offenbart in Kakkis et al., Protein Expr. Purif. 5: 225–232 (1994), an. In der unteren Tafel werden die Ergebnisse der SDS-PAGE von gereinigter α -L-Iduronidase mit Verunreinigungen aus einem unveröffentlichten Herstellungs-/Reinigungsprozess aus dem Stand der Technik (US-Patentanmeldung Seriennummern 09/078,209 und 09/170,977), bezeichnet als Carson-Verfahren, in den Spuren 2 (7,5 Mikrogramm α -L-Iduronidase) und 3 (5,0 Mikrogramm α -L-Iduronidase) mit den Ergebnissen des Herstellungs-/Reinigungsverfahrens der vorliegenden Erfindung verglichen, das als Galli-Verfahren bezeichnet wird (Spur 4, 5 Mikrogramm α -L-Iduronidase). Spur 1 enthält den Molekulargewichtsmarker. [Fig. 2](#) zeigt, dass das erfindungsgemäße Galli-Verfahren der Herstellung/Reinigung ein hochgradig gereinigtes α -L-Iduronidase-Produkt mit weniger Verunreinigungen im Vergleich zu den Produktions-/Reinigungs-Schemata aus dem Stand der Technik erbringt.
- [0034]** [Fig. 3](#) zeigt das α -Iduronidase-Produktionsniveau über eine Zeitspanne von 30 Tagen, während der die Zellen an Tag 5 von einem serumhaltigen Medium auf ein serumfreies Medium umgestellt werden. Die Produktion von α -Iduronidase war gekennzeichnet durch: (1) Das Fehlen einer Notwendigkeit der Anpassung, als die Zellen am 02.10.00 von serumhaltigem Medium auf serumfreies Medium umgestellt wurden (obere und untere Tafeln), dieses mit einem nicht unterbrochenen Anstieg der Produktivität (obere Tafel); (2) ein hohes Produktionsniveau mit über 4 mg pro Liter (1000 pro ml) in einem proteinfreien Medium (untere Tafel); und (3) einen massiven Anstieg der Produktion von α -Iduronidase bei Ereignissen der Butyrat-Induktion (untere Tafel).
- [0035]** [Fig. 4](#) zeigt eine Abnahme des Lebervolumens während der Enzymtherapie bei MPS I-Patienten.
- [0036]** [Fig. 5](#) zeigt die über den Urin stattfindende GAG-Exkretion während der Enzymtherapie.
- [0037]** [Fig. 6](#) zeigt die Ellbogen- und Knie-Streckung bei HAC002 während der Enzymtherapie.
- [0038]** [Fig. 7](#) zeigt die Schulterbeugung bis zu 104 Wochen bei vier Patienten mit der stärksten Einschränkung im Verlauf der Enzymtherapie.

[0039] [Fig. 8](#) zeigt die Besserung der Schlaf-Apnoe vor und nach sechs Wochen der Therapie.

[0040] [Fig. 9](#) zeigt die Verbesserung bei Apnoe und Hypopnoe während des Schlafes bei der Enzymtherapie in jedem einzelnen Patienten.

[0041] [Fig. 10](#) zeigt die Verbesserung von Lungenfunktionstests vor und nach 12 und 52 Wochen der Enzymtherapie bei einem Patienten.

[0042] [Fig. 11](#) zeigt eine gesteigerte Geschwindigkeit des Längenwachstums bei der Enzymtherapie.

[0043] [Fig. 12](#) zeigt das Ausmaß der Verunreinigung durch chinesisches Hamster-Ovarialprotein (CHOP) und das Ausmaß der Reinheit von α -L-Iduronidase, hergestellt durch (1) das Carson-Verfahren, ein unveröffentlichtes Herstellungs-/Reinigungsverfahren aus dem Stand der Technik (US-Patentanmeldung Seriennummern 09/078,209 und 09/170,977) und (2) das Galli-Verfahren, das Herstellungs-/Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung. Somit zeigt [Fig. 12](#), dass α -L-Iduronidase, die durch das Galli-Verfahren hergestellt und gereinigt wurde, ein höheres Maß an Reinheit und ein niedrigeres Maß an CHOP-Verunreinigung im Vergleich zu dem Produkt des Carson-Verfahrens besitzt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0044] Bei einem Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von α -L-Iduronidase in Mengen, die es erlauben, das Enzym therapeutisch zu verwenden. Im allgemeinen zeichnet sich das Verfahren dadurch aus, dass eine geeignete Zelllinie mit einer cDNA transformiert wird, die für die Gesamtheit von α -L-Iduronidase oder ein biologisch aktives Fragment oder eine Mutante hiervon codiert. Fachleute können für eine optimale Produktion von α -L-Iduronidase in geeigneten, damit transfizierten Zelllinien andere Expressionskonstrukte als die hier ausdrücklich beschriebenen herstellen. Darüber hinaus können begabte Fachleute leicht cDNA-Fragmente erstellen, die biologisch aktive Fragmente und Mutanten der natürlich vorkommenden α -L-Iduronidase codieren, die die gleiche oder ähnliche biologische Aktivität wie das natürlich vorkommende Enzym voller Länge besitzen.

[0045] Um eine rekombinante Quelle für α -L-Iduronidase herzustellen, kann eine große Serie von Expressionsvektoren konstruiert und auf die Expression einer α -L-Iduronidase-cDNA hin getestet werden. Auf Basis von transienten Transfektionsexperimenten ebenso wie von stabilen Transfektionen kann ein Expressionskonstrukt identifiziert werden, das ein besonders hohes Niveau der Expression bereitstellt. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liefert eine chinesische Hamsterzelllinie, 2.131, entwickelt durch die Transfektion des α -L-Iduronidase-Expressionskonstrukts und die Selektion auf einen hochgradig exprimierenden Klon, eine Expression auf besonders hohem Niveau. Eine solche chinesische Hamsterzelllinie gemäß dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann etwa 5.000- bis 7.000-mal mehr α -L-Iduronidase sekretieren als normal. Die dadurch hergestellte α -L-Iduronidase kann korrekt prozessiert werden, mit hoher Affinität in Zellen aufgenommen werden und korrigierend bei für α -L-Iduronidase defizienten Zellen wirken, wie etwa bei Zellen von Patienten, die unter dem Hurler-Syndrom leiden.

[0046] Das Verfahren zur Herstellung von α -L-Iduronidase in Mengen, die es erlauben, das Enzym therapeutisch zu nutzen, zeichnet sich durch ein Produktionsverfahren aus, das spezifisch für die Massenproduktion von Enzym kommerzieller Qualitätsstufe entworfen wurde, wobei die Qualität des Enzyms durch Verwaltungsautoritäten der verschiedenen Länder als für die Anwendung beim Menschen akzeptabel bestimmt wurde. Die im Großmaßstab erfolgende Herstellung von Enzym kommerzieller Qualitätsstufe erfordert Modifikationen der Zellkulturgröße, des Mikroträger-Systems und des Reinigungsschemas. Bei bevorzugten Ausführungsformen wird die Zellkulturgröße von 45 Litern auf 110 Liter oder mehr gesteigert, mit einem Wechsel zur kontinuierlichen Perfusion. Die Zunahme des Größenmaßstabs ist notwendig, um hinreichend viel Material für eine potentiell im Großmaßstab erfolgende Produktion für den langfristigen Gebrauch am Patienten zu produzieren. Gemäß bevorzugten Ausführungsformen eines solchen Prozesses werden Mikroträger als kostengünstige skalierbare Oberfläche verwendet, auf der anhaftende Zellen zu züchten sind. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen sind solche Mikroträger makroporös und spezifisch aus modifizierten Kohlenhydraten, wie etwa Cellulose, z.B. bei Cytopore Beads, hergestellt von Pharmacia, zusammengesetzt. Makroporöse Cellulose-Mikroträger erlauben eine verbesserte Zellanhaftung und liefern eine größere Oberfläche für die Anhaftung, von der erwartet wird, dass sie während des Kulturprozesses eine gesteigerte Zelldichte liefert. Von höheren Zelldichten wird erwartet, dass sie die Produktivität erhöhen. Bei bevorzugten Ausführungsformen werden Heparin-Sepharose- und Sephacryl 200-Säulen durch blaue Sepharose- und Kupfer chelierende Säulen ersetzt, um die Kapazität des im Großmaßstab stattfindenden Reinigungsverfahrens zu erhöhen und um die

Reinheit des Produkts zu verbessern. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Kupfer chelierende Säule verwendet, um die Proteinverunreinigungen durch die chinesischen Hamster-Ovarialzellen auf sehr niedrige Niveaus, die für den Vertrieb im Großmaßstab geeignet sind, zu verringern. Unter Verwendung von Ausführungsformen des vorliegenden Verfahrens, die sich durch die unten beschriebenen Modifikationen und Induktion auszeichnen, können etwa 15 mg pro Liter Kultur pro Tag oder mehr bei Spitzenwerten der Kulturdichte, ausgehend von einem 110 Liter großen Kultursystem, produziert werden.

[0047] Gemäß anderen bevorzugten Ausführungsformen des Verfahrens zur Herstellung von α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Kultursystem optimiert. Bei einer ersten Ausführungsform wird der Kultur-pH während des Produktionsverfahrens auf etwa 6,5 bis 7,0, bevorzugt auf etwa 6,7 bis 7,0, gesenkt. Ein Vorteil eines solchen pH-Werts besteht darin, dass er die Akkumulation lysosomaler Enzyme, die bei saurem pH stabiler sind, befördert. Bei einer zweiten Ausführungsform können immerhin 2 bis 3,5 Kulturvolumina des Mediums während jeder 24-stündigen Phase durch kontinuierliche Perfusion ausgetauscht werden. Ein Vorteil dieser Prozedur besteht darin, dass die Sekretionsrate von rekombinanter α -L-Iduronidase gesteigert und mehr aktives Enzym eingefangen wird. Bei einer dritten Ausführungsform wird die Sauerstoffsättigung auf etwa 40% optimiert. Bei einer vierten Ausführungsform werden makroporöse Mikroträger mit anfänglich etwa 5% Serum im Medium verwendet, um eine Zellmasse zu produzieren, gefolgt von einer raschen Auswasch-Verschiebung hin zu einem proteinfreien Medium für die Produktion (**Fig. 3**). Bei einer fünften Ausführungsform kann ein proteinfreies Wachstumsmedium, wie etwa ein JRH Biosciences PF-CHO-Produkt, optimiert werden, um zusätzliche Mengen von einem oder mehreren Inhaltsstoffen einzubeziehen, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus: Glutamat, Aspartat, Glycin, Ribonukleosiden und Desoxyribonukleosiden. Bei einer sechsten Ausführungsform können immerhin 2 bis 3,5 Kulturvolumina an Medium während jeder 24-stündigen Zeitspanne durch kontinuierliche Perfusion ausgetauscht werden. Ein solcher Induktionsprozess kann einen etwa 2-fachen Anstieg der Produktion ohne signifikante Veränderung der posttranslationalen Prozessierung bereitstellen.

[0048] Besonders bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens zur Herstellung von α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung zeichnen sich durch eine, mehr als eine oder alle hier beschriebenen Optimierungen aus und können verwendet werden, wie unten in größerem Detail beschrieben. Das Produktionsverfahren der vorliegenden Erfindung kann daher ein Produktionskulturverfahren mit den folgenden Merkmalen bereitstellen:

1. Eine auf Mikroträgern basierende Kultur unter Verwendung makroporöser Mikroträger-Beads, hergestellt aus modifizierter Cellulose oder einem Äquivalent hiervon, wird bevorzugt in Kulturgefäßen für den Großmaßstab mit Overhead-Rühren oder einem Äquivalent hiervon verwendet. Die Anheftung von Zellen an diese Beads kann erreicht werden durch Kultur in einem 5%igen fetalen Rinderserum, das hinzugegeben werden kann zu DME/F12 1:1 oder einem proteinfreien Medium, das modifiziert wird mit Inhaltsstoffen, einschließlich Ribonukleosiden, Desoxyribonukleosiden, Pyruvat, nicht-essentiellen Aminosäuren und HEPES. Nach etwa 3–6 Tagen in diesem Medium, beginnt man eine Auswasch-Prozedur, bei dem proteinfreies Medium das serumhaltige Medium in Abhängigkeit vom Glukosegehalt und den Kulturbedingungen mit einer steigenden Perfusionsrate ersetzt. Nachfolgend und während der gesamten verbleibenden Kulturperiode werden die Zellen in einem proteinfreien Medium kultiviert. Die Verwendung eines proteinfreien Mediums bei der Enzymproduktion ist nützlich bei der Reduzierung des Expositionsrisikos gegenüber boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) und anderen infektiösen biologischen Agenzien, wie etwa Viren, für Patienten, die mit dem Enzym behandelt werden, wobei hierbei das Risiko von BSE oder anderen schädlichen Agenzien vom Ausmaß der potentiellen Serumexposition abhängig ist. Bei zuvor veröffentlichten Studien waren die zur Züchtung von Zellen verwendeten Träger Rindergelatine-Mikroträger, verwendet mit 1 Gramm pro Liter oder dem 100-fachen der Produktkonzentration. Die Auswaschung von 1% des Gelatineproteins aus den Mikroträgern würde eine relativ gesehene 100% Kontamination darstellen und somit zum Risiko von BSE beitragen. Daher basieren die neuen Träger entweder auf Dextran oder Cellulose und bestehen aus Kohlenhydraten und nicht von Tieren abgeleiteten Materialien.

Fig. 3 zeigt, dass die Zellen in dem 5% Serum enthaltenden Medium zu einer Dichte herangezüchtet und dann ohne irgendeine Anpassung auf ein proteinfreies Medium umgestellt wurden. **Fig. 3** zeigt in spezifischer Weise, dass 1) Zellen überleben und mit der Iduronidase-Produktion fortfahren, wenn sie ohne Anpassung einem Wechsel unterzogen werden. Im Gegensatz dazu deuten andere Studien an, dass eine Anpassung an ein proteinfreies Medium notwendig ist. Bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung wird die Enzymproduktion auf Niveaus fortgesetzt, die denen bei serumhaltigem Medium vergleichbar sind. 2) α -L-Iduronidase, die in einem proteinfreien Medium hergestellt wird, behält ein Produktionsniveau von über 4 mg pro Liter oder 1.000 Units pro ml aufrecht. 3) α -L-Iduronidase, die in einem proteinfreien Medium hergestellt wird, zeigt eine hohe Aufnahme, die anzeigt, dass eine Verschiebung im Medium, und somit eine Verschiebung der Kohlenhydrate, die Zellen zugeführt werden, das Charakteristikum einer hohen Aufnah-

me des Enzyms nicht nachträglich beeinflusst. Acht Chargen an α -L-Iduronidase sind produziert und auf diese Weise freigesetzt worden, mit einem halbmaximalen Aufnahmewert von weniger als 2 nM in allen Chargen.

2. Die Kulturbedingungen werden bevorzugt aufrechterhalten bei einem gelösten Sauerstoffgehalt von 40% Luftsättigung bei einem pH von etwa 6,8–7,0 und bei einer Temperatur von etwa 35–37°C. Dies kann erreicht werden unter Verwendung einer Kontrolleinheit, einer Überwachungseinheit und geeigneter Sonden, wie etwa solchen, die von Applikon® oder Mettler® produziert werden. Jedoch werden begabte Techniker rasch erkennen, dass dies leicht durch gleichwertige Kontrollsysteme erreicht werden kann, die von anderen Herstellern produziert werden. Eine Luftsättigung von etwa 40% resultiert in einer verbesserten Sekretion von α -L-Iduronidase, und es kann eine bis zu 80%ige Luftsättigung verwendet werden. Jedoch führen weitere Steigerungen an Sauerstoff, z.B. eine 90%ige Luftsättigung, nicht zu einer gegenüber der 80%igen Luftsättigung signifikant gesteigerten Sekretion. Der gelöste Sauerstoff kann durch diskontinuierliches oder kontinuierliches Sauerstoffeinspitzen unter Verwendung einer 5 Mikron großen oder mit einer größeren Öffnung versehenen Einspritzvorrichtung aus rostfreiem Stahl oder eines Äquivalents hiervon zugeführt werden. Ein pH von etwa 6,8–7,0 ist optimal für die Akkumulation des α -L-Iduronidase-Enzyms. Das Enzym ist besonders instabil bei pHs oberhalb von etwa 7,0. Unterhalb eines pH-Werts von etwa 6,7 kann die Sekretionsrate abnehmen, insbesondere unterhalb eines pH-Werts von etwa 6,5. Die Kultur wird daher optimal zwischen einem pH von etwa 6,8–7,0 gehalten.

3. Das Produktionskulturmedium kann eine modifizierte Form des kommerziell erhältlichen, inhabereigenen Mediums von JRH Biosciences, das Excell PF CHO genannt wird, sein. Dieses Medium unterstützt Niveaus der Sekretion, die gleichwertig zu dem eines Serums sind, das eine Zelllinie, wie etwa die Zelllinie 2.131, verwendet. Es kann bevorzugt modifiziert werden, um einen sauren pH von etwa 6,8–7,0 ($\pm 0,1$) zu besitzen, und mit HEPES bei 7,5 mM oder 15 mM gepuffert werden. Das Medium kann 0,05 bis 0,1% an Pluronic F-68 (BASF), ein nicht-ionisches Tensid, oder ein Äquivalent hiervon enthalten, das sich durch den Vorteil auszeichnet, Zellen vor mit dem Einspritzen assoziierten Scherkräften zu schützen. Das Medium kann weiterhin einen inhabereigenen Zusatzstoff enthalten, der wichtig ist, um die Produktivität des Mediums gegenüber anderen derzeit erhältlichen proteinfreien Medien zu erhöhen. Fachleute werden leicht verstehen, dass die Auswahl des Kulturmediums kontinuierlich gemäß bestimmten kommerziellen Ausführungsformen optimiert werden kann, die zu bestimmten Zeitpunkten verfügbar sind. Solche Änderungen umfassen nicht mehr als Routineversuche und sollen im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung liegen.

4. Das Produktionsmedium kann unter Verwendung eines Aminosäureanalysators, der das verbrauchte Medium mit dem Ausgangsmedium vergleicht, analysiert werden. Solche Analysen haben gezeigt, dass die Zelllinie 2.131 ein Standard-PF CHO-Medium bei Glycin, Glutamat und Aspartat bis zu einem Niveau von etwa 10% der Ausgangskonzentration leert. Eine Supplementierung dieser Aminosäuren auf höhere Spiegel kann in einer verstärkten Kulturdichte und Produktivität resultieren, die zu einer 2–3-fach höheren Produktion als der an der Basislinie führen kann. Begabte Fachleute werden bemerken, dass andere Zelllinien im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung gleichermaßen nützlich für die Produktion von α -L-Iduronidase gemäß dem vorliegenden Verfahren sein können. Somit kann mehr oder weniger an zusätzlichen Nährstoffen erforderlich sein, um das Medium zu optimieren. Solche Optimierungen sollen im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung liegen und sollten ohne übermäßiges Experimentieren praktiziert werden können.

5. Das Medium kann mit den vier Ribonukleosiden und den vier Desoxyribonukleosiden jeweils mit etwa 10 mg/Liter supplementiert werden, um die für die Dihydrofolat-Reduktase defiziente Zelllinie 2.131 zu unterstützen. Begabte Techniker werden erkennen, dass andere Zelllinien im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung gleichermaßen nützlich sein können, um α -L-Iduronidase gemäß dem vorliegenden Verfahren zu produzieren. Somit kann mehr oder weniger der Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside erforderlich sein, um das Medium zu optimieren, und es können alternative Quellen der Purine und Pyrimidine für die Nukleinsäuresynthese verwendet werden, wie etwa Hypoxanthin und Thymidin. Solche Optimierungen sollen im Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung liegen und sollten ohne übermäßiges Experimentieren praktiziert werden können.

6. Nach Erreichen von Konfluenz bei etwa 3–6 Tagen der Kultur wird eine zunehmende Rate an kontinuierlicher Perfusion gestartet. Es kann ein Austausch des Mediums durchgeführt werden, z.B. unter Verwendung eines abgeschrägten Zuleitungsrohrs, das so konstruiert und positioniert ist, dass es die Aufnahme von Medium ohne die Entfernung der Mikroträger erlaubt, selbst wenn die Kultur gerührt wird. Durch das Abpumpen von Medium durch das abgeschrägte Zuleitungsrohr setzen sich die Mikroträger im Inneren der Kultur im Rohrkörper ab und werden während des Mediumwechsels nicht aus der Kultur entfernt. Auf diese Weise werden die Mikroträger mit der Zellmasse von dem Überstand, der das Enzym enthält, abgetrennt.

7. Der schnelle und häufige Umsatz des Mediums ist durch Produktivitätsstudien gezeigt worden, um in einer verbesserten allgemeinen Gewinnung des Enzyms aus der Zellkultur zu resultieren. Ein geringerer Umsatz an Medium resultiert in einer geringeren Gesamtproduktion an Enzym bezogen auf die Tagesbasis. Unter Verwendung von Perfusionen von 2 bis 3,5 Kulturvolumina pro Tag können die Zellen in exzellentem

Zustand mit hohen Ausmaßen an Lebensfähigkeit und hohen Niveaus der Produktivität gehalten werden.

8. Die Produktion von α -L-Iduronidase kann durch die Verwendung von Natriumbutyrat-Induktion der Genexpression verstärkt werden (**Fig. 3**). Es wurden zwanzig Chargen von α -L-Iduronidase produziert, wobei eine Butyrat-Induktion bei einer Konzentration von 2 mM mit 2/3 Auswaschung alle 12 Stunden nach der Induktion und einer erneuten Induktion alle 48 Stunden für eine 21-tägige Produktionsphase verwendet wurden. In **Fig. 3** zeigen die vertikalen Pfeile im unteren Bereich die Ereignisse der Butyrat-Induktion an. Jede Induktion löste eine massive Zunahme der α -L-Iduronidase-Konzentration im Medium aus.

Systematische Studien bei einer 2.131-Zelllinie zeigten, dass etwa 2 mM Butyrat appliziert werden können und in einer etwa zweifachen oder größeren Induktion der Enzymproduktion mit minimalen Auswirkungen auf die Kohlenhydrat-Prozessierung resultieren. Für niedrigere Butyratspiegel ist nicht gezeigt worden, dass sie ebenso gut induzieren, und wesentlich höhere Spiegel können in einer höheren Induktion resultieren, jedoch mit einer abnehmenden Affinität des produzierten Enzyms für Zellen von Patienten, die unter einer α -L-Iduronidase-Defizienz leiden. Eine in vitro durchgeführte Butyrat-Induktion bei 2 mM für 24 Stunden oder bei 5 mM, eine gebräuchlicher verwendete Konzentration, resultierte in Aufnahmen von über 3 nM oder 40 U/ml, bzw. einem durchschnittlich Dreifachen des Wertes, der in den Produktionschargen beobachtet wurde. Zusätzlich jedoch waren die gebräuchlich verwendeten Zeiten von 24 Stunden oder mehr und eine Konzentration von 5 mM toxisch für die α -L-Iduronidase produzierenden Zellen und resultierten in Ablösung und einem Verlust von Zellmasse.

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine zweifache oder größere Induktion in einer geringeren Prozessierung der Kohlenhydrate und in einer geringeren Phosphatanfügung an das Enzym, sowie in steigender Toxizität resultiert. Im Hinblick auf die Kohlenhydrat-Prozessierung und die Anfügung von Phosphatgruppen wird die Wichtigkeit von Mannose-6-Phosphat bei der Enzyersatz-Therapie durch die Beobachtungen gezeigt, dass die Entfernung des Phosphats von zwei lysosomalen Enzymen, Glucosidase und Galactosamin-4-Sulfatase, zu einer verringerten Aufnahme führt (Van der Ploeg et al., J. Clin. Invest. 87: 513–518 (1991); Crawley et al., J. Clin. Invest. 97: 1864–1873 (1996)). Zusätzlich benötigt phosphatarmes Enzym (Van Hove et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 65–70 (1996)) 1.000 Units pro ml bei den Aufnahmeexperimenten (nahezu das Hundertfache dessen, das bei Iduronidase verwendet wird), und wirksame Dosen bei Tiermodellen erfordern 14 mg/kg oder das 28-fache der Dosis, die bei hoch phosphatreicher Iduronidase verwendet wird (Kikuchi et al., J. Clin. Invest. 101: 827–833 (1998)).

Ein besonders bevorzugter Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet eine 2 mM Butyrat-Zugabe alle 48 Stunden zu dem Kultursystem. Diese Ausführungsform resultiert in einer etwa zweifachen Induktion der Enzymproduktion unter Verwendung dieses Verfahrens ohne signifikante Wirkung auf die Aufnahmeaffinität des Enzyms (K-Aufnahme von weniger als 30 U/ml oder 2,0 mM).

9. Bei bevorzugten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung eine rekombinante chinesische Hamster-Ovarialzelllinie, wie etwa die Zelllinie 2.131, die stabil und verlässlich Mengen von α -L-Iduronidase produziert. Bei bevorzugten Ausführungsformen kann die Zelllinie mehr als 1 Kopie eines Expressionskonstrukts enthalten, dieses umfassend einen CMV-Promotor, ein α -Intron, eine cDNA für humane α -L-Iduronidase, sowie eine Polyadenylierungssequenz von Rinderwachstumshormon. Bei noch bevorzugteren Ausführungsformen exprimiert die Zelllinie α -L-Iduronidase in Mengen von wenigstens etwa 20–40 Mikrogramm pro 10^7 Zellen pro Tag in einer korrekt prozessierten, hohe Aufnahme gewährleistenden Form, die für die Enzyersatz-Therapie geeignet ist. Gemäß bevorzugten Ausführungsformen dieses Aspekts der Erfindung besitzt die transfizierte Zelllinie, die angepasst ist, um α -L-Iduronidase in Mengen zu erzeugen, die die therapeutische Verwendung des Enzyms erlauben, eines oder mehrere der folgenden Merkmale:

1. Die Zelllinie bevorzugter Ausführungsformen wird von einer Elternzelllinie abgeleitet, wobei die Zellen Kulturpassagen unterzogen werden, bis sie eine kleinere Größe und eine schnellere Wachstumsrate angenommen haben und sich bereitwillig an die Substrate anheften.

2. Die Zelllinie bevorzugter Ausführungsformen wird mit einem Expressionsvektor transfiziert, der das Cytomegalievirus-Promotor-/Enhancer-Element, ein 5'-Intron, bestehend aus dem murinen α -Intron zwischen den Exons 2 und 3, eine humane cDNA von etwa 2,2 kb Länge und eine 3'-Polyadenylierungsstelle des Rinderwachstumshormons enthält. Dieser Expressionsvektor kann beispielsweise zusammen mit jedem gebräuchlichen Selektionsvektor, wie etwa pSV2NEO, in einem Verhältnis von 50 zu 1 transfiziert werden. Der Selektionsvektor pSV2NEO verleiht wiederum G418-Resistenz bei erfolgreich transfizierten Zellen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen wird ein Verhältnis von etwa 50 zu 1 verwendet, da dieses Verhältnis die Annahme von Inserts mit multipler Kopienzahl verstärkt. Gemäß einer Ausführungsform, bei der die chinesische Hamster-Ovarialzelllinie 2.131 bereitgestellt wird, liegt wenigstens eine Kopie des Expressionsvektors für α -L-Iduronidase vor. Eine solche Zelllinie hat die Fähigkeit gezeigt, große Mengen an humaner α -L-Iduronidase (mindestens 20 Mikrogramm pro 10 Millionen Zellen pro Tag) zu produzieren. Besonders bevorzugte Ausführungsformen, wie etwa die Zelllinie 2.131, besitzen die Fähigkeit, in hinreichender Menge korrekt prozessiertes Enzym zu produzieren, das N-gebundene Oligosaccharide mit mannosereichen Ketten enthält, die an der Position 6 mit Phosphat modifiziert sind, um ein Enzym mit ho-

her Affinität zu produzieren (K-Aufnahme kleiner als 3 nM).

3. Das von den Zelllinien der vorliegenden Erfindung, wie etwa von der chinesischen Hamster-Ovarialzelllinie 2.131, produzierte Enzym wird rasch in Zellen assimiliert, eliminiert die Glykosaminoglykan-Speicherung und besitzt eine Halbwertszeit von etwa 5 Tagen in Zellen von Patienten, die unter einer α -L-Iduronidase-Defizienz leiden.

4. Die Zelllinie bevorzugter Ausführungsformen, wie etwa eine 2.131-Zelllinie, passt sich an die Kultur im Großmaßstab an und produziert unter diesen Bedingungen stabil humane α -L-Iduronidase. Die Zellen bevorzugter Ausführungsformen sind in der Lage, bei einem sauren pH von etwa 6,6 bis 7,0, bei dem eine gesteigerte Akkumulation von α -L-Iduronidase stattfinden kann, zu wachsen und α -L-Iduronidase zu sekretieren.

5. Besonders bevorzugte Ausführungsformen der Zelllinie gemäß der Erfindung, wie etwa eine 2.131-Zelllinie, sind befähigt, humane α -L-Iduronidase auf Niveaus zu sekretieren, die 2.000 Units pro ml (8 Mikrogramm pro ml) bei zwei Ernten pro Tag überschreiten, oder die 15 mg pro Liter der Kultur pro Tag unter Verwendung eines speziell formulierten proteinfreien Mediums überschreiten.

[0049] Die Produktion adäquater Mengen an rekombinanter α -L-Iduronidase ist eine entscheidende Vorbedingung für Studien über die Struktur des Enzyms sowie zur Enzymersatz-Therapie. Die Zelllinien gemäß der vorliegenden Erfindung erlauben die Produktion signifikanter Mengen an rekombinanter α -L-Iduronidase, die für die Aufnahme in geeigneter Weise prozessiert ist. Die Überexpression in chinesischen Hamster-Ovarialzellen (CHO-Zellen) ist für drei weitere lysosomale Enzyme beschrieben worden: α -Galactosidase (Ioannou et al., J. Cell. Biol. 119: 1137–1150 (1992)), Iduronat-2-sulfatase (Bielicki et al., Biochem. J. 289: 241–246 (1993)) und N-Acetylgalactosamin-4-sulfatase (Amson et al., Biochem. J. 284: 789–794 (1992)), wobei eine Vielzahl von Promotoren, und, in einem Fall, Amplifikation, verwendet wird. Die vorliegende Erfindung betrifft eine für Dihydrofolat-Reduktase defiziente CHO-Zelllinie, jedoch ist gemäß bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung Amplifikation unnötig. Zusätzlich liefert die vorliegende Erfindung ein hohes Expressionsniveau der humanen α -L-Iduronidase unter Verwendung des sehr frühen Gen-Promotors/Enhancers von CMV.

[0050] Die vorliegende Erfindung betrifft bei bevorzugten Ausführungsformen einen Expressionsvektor, der ein Cytomegalievirus-Promotor-/Enhancer-Element, ein 5'-Intron, bestehend aus dem murinen Ca-Intron, abgeleitet von dem murinen Immunglobulin-Ca-Gen der langen Kette zwischen den Exons 2 und 3, eine humane cDNA von etwa 2,2 kb Länge und eine 3'-Polyadenylierungsstelle von Rinderwachstumshormon umfasst. Dieser Expressionsvektor kann z.B. in einem Verhältnis von etwa 50:1 zusammen mit jedem geeigneten, gebräuchlichen Selektionsvektor, wie etwa pSV2NEO, transfiziert werden. Der Selektionsvektor, wie etwa pSV2NEO, verleiht wiederum G418-Resistenz bei erfolgreich transfizierten Zellen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen wird ein Verhältnis des Expressionsvektors zum Selektionsvektor von 50 zu 1 verwendet, da dieses Verhältnis die Annahme von Inserts mit multipler Kopienzahl fördert. Gemäß einer Ausführungsform, bei der die chinesische Hamsteroarial-Zelllinie 2.131 bereitgestellt wird, liegen etwa 10 Kopien des Expressionsvektors für α -L-Iduronidase vor. Ein solches Expressionskonstrukt hat die Fähigkeit gezeigt, große Mengen an humaner α -L-Iduronidase (mindestens 20 Mikrogramm pro 10 Millionen Zellen pro Tag) in einer geeigneten Zelllinie, wie etwa der chinesischen Hamsteroarial-Zelllinie 2.131, zu produzieren.

[0051] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung produzieren eine weitgehend reine α -L-Iduronidase, die korrekt prozessiert wird, in einer hohen Aufnahme gewährleistenden Form vorliegt, die für die Enzymersatz-Therapie geeignet ist und bei der Therapie in vivo effektiv ist.

[0052] Die spezifische Aktivität der α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung liegt bei über etwa 200.000 Units pro Milligramm Protein. Bevorzugt übersteigt sie etwa 240.000 Units pro Milligramm Protein, wenn die ursprünglichen Testverfahren für Aktivität und Proteinkonzentration verwendet werden. Ein neuer validierter Test für das gleiche Enzym, bei dem die Units als Mikromol pro Minute ausgedrückt werden, zeigt eine Aktivität von 100 Units/ml (Bereich von 70–130) und eine Proteinkonzentration durch Extinktion bei 280 nm von 0,7 mg/ml (0,6–0,8) mit einer durchschnittlichen spezifischen Aktivität von 143 Units pro mg. Das Molekulargewicht der die volle Länge besitzenden α -L-Iduronidase der vorliegenden Erfindung beträgt etwa 82.000 Dalton, umfassend etwa 70.000 Dalton an Aminosäuren und 12.000 Dalton an Kohlenhydraten. Das rekombinante Enzym der vorliegenden Erfindung wird sogar effizienter durch Endozytose aufgenommen als es zuvor für eine partiell gereinigte Präparation des Enzyms aus Urin beschrieben wurde. Das rekombinante Enzym gemäß der vorliegenden Erfindung ist wirksam beim Reduzieren der Akkumulation von radioaktivem, S-markiertem GAG in für α -L-Iduronidase defizienten Fibroblasten, was anzeigt, dass es zu Lysosomen, dem Ort der GAG-Speicherung, transportiert wird. Die bemerkenswert niedrige Konzentration an α -L-Iduronidase, die für eine solche Korrektur benötigt wird (halbmaximale Korrektur bei 0,7 pM) kann für den Erfolg der Enzymersatz-Therapie sehr wichtig sein.

[0053] Die humane cDNA von α -L-Iduronidase lässt ein Protein mit 653 Aminosäuren und einem angenommenen Molekulargewicht von 70.000 Dalton nach der Abspaltung des Signalpeptids erwarten. Die Aminosäuresequenzierung offenbart Alanin 26 am N-Terminus, was ein erwartetes Protein von 629 Aminosäuren ergibt. Humane rekombinante α -L-Iduronidase besitzt ein Histidin an Position 8 des reifen Proteins. Die vorhergesagte Proteinsequenz umfasst sechs potentielle N-gebundene Oligosaccharid-Modifikationsstellen. Alle von diesen können im rekombinanten Protein modifiziert werden. Für die dritte und sechste Stelle ist gezeigt worden, dass diese ein oder mehrere Mannose-6-Phosphatreste aufweisen, die für die hochaffine Aufnahme in Zellen verantwortlich sind. Das folgende Peptid entspricht den Aminosäuren 26–45 der humanen rekombinanten α -L-Iduronidase mit einem N-terminalen Alanin und der folgenden Sequenz (SEQ ID NO: 2):

Ala-Glu-Ala-Pro-His-Leu-Val-His-Val-Asp-Ala-Ala-Arg-Ala-Leu-Trp-Pro-Leu-Arg-Arg

[0054] Die Überexpression der α -L-Iduronidase der vorliegenden Erfindung resultiert nicht in einer allgemeinen Sekretion anderer lysosomaler Enzyme, die von Mannose-6-Phosphat-Zielsteuerung abhängig sind. Die sekretierte rekombinante α -L-Iduronidase ist normalem sekretierten Enzym in vielen Aspekten ähnlich. Ihre molekulare Größe, die in verschiedenen Bestimmungen mit 77, 82, 84 und 89 kDa ermittelt wurde, ist vergleichbar mit 87 kDa, wie es für Korrektiven Faktor aus Urin (urinary corrective factor, siehe Barton et al., J. Biol. Chem. 246: 7773–7779 (1971)) und mit 76 kDa und 82 kDa, wie es für ein Enzym ermittelt wurde, das durch kultivierte humane Fibroblasten sekretiert wird (Myerowitz et al., J. Biol. Chem. 256: 3044–3048 (1991); Taylor et al., Biochem. J. 274: 263–268 (1991)). Die Unterschiede in und zwischen diesen Studien werden Ungenauigkeiten bei den Messungen zugeschrieben. Das Muster der intrazellulären Prozessierung des rekombinanten Enzyms, eine geringe Abnahme der molekularen Größe und das schließliche Auftauchen einer zusätzlichen Bande von weniger als 9 kDa ist das gleiche wie bei dem humanen Fibroblastenenzym. Diese schnellere Bande entsteht durch die proteolytische Abspaltung von 80 N-terminalen Aminosäuren.

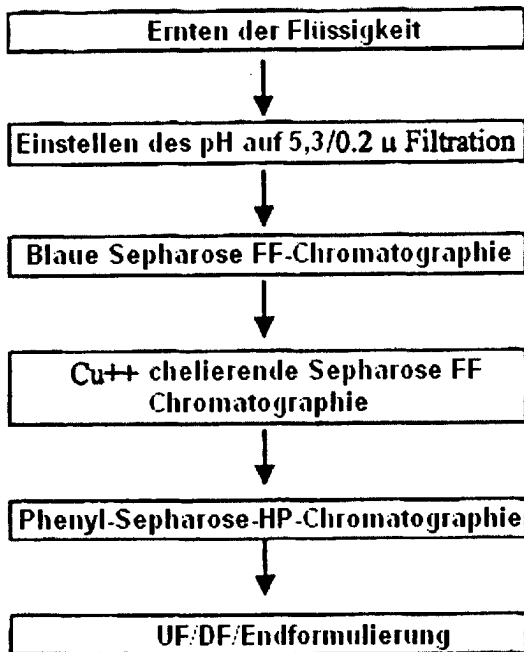
[0055] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Verfahren zur Reinigung von α -L-Iduronidase. Bei bevorzugten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Reinigung von rekombinanter α -L-Iduronidase, das optimiert wurde, um eine schnelle und effiziente Reinigung mit validierbaren Chromatographieharzen und leichter Beladungs-, Wasch- und Eluier-Operation zu verwirklichen. Das Verfahren zur Reinigung von α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung beinhaltet eine Reihe von Säulenchromatographie-Schritten, die eine mit hoher Ausbeute verbundene Reinigung von Enzym aus proteinfreiem Produktionsmedium erlauben. Spezifisch ausgedrückt, wurden Concanavalin A-Sepharose, Heparin-Sepharose und Sephacryl 200 Säulen durch blaue Sepharosesäulen und Kupfer chelierende Säulen ersetzt, um die Kapazität eines Reinigungsprozesses für den Großmaßstab zu erhöhen, um mögliche Auswaschungen zu reduzieren und die Reinheit des Produkts zu verbessern. Concanavalin A-Lektin, ein aus Pflanzen abgeleitetes Protein-Lektin, wird oft verwendet, um Enzym in einem anfänglichen Reinigungsschritt in der zuvor veröffentlichten Studie zu binden. Von Concanavalin A ist bekannt, dass es aus Säulen ausgewaschen wird und lysosomale Enzympräparationen verunreinigt. Eine solche Auswaschung kann die Aktivierung von T-Zellen bei behandelten Patienten verursachen und ist somit als für die Anwendung beim Menschen ungeeignet bestimmt (Furbish et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3560–3563 (1977)). Somit wird die Verwendung von Concanavalin A bei dem vorliegenden Reinigungsschema vermieden. Bei einer vorherigen Studie konnte α -L-Iduronidase aus menschlicher Leber nicht ohne hohe Konzentrationen an Detergens-Denaturierung (1% Triton X100) aus Phenylsäulen wiedergewonnen werden. Somit wurde in einem veröffentlichten Reinigungsschema für dieses Enzym keine Phenylsäule verwendet (Clements et al., Eur. J. Biochem. 152: 21–28 (1985)). Das endogene humane Leberenzym wird innerhalb der Lysosomen hochgradig durch Hydrolasen modifiziert, die Sialinsäure und Phosphatreste entfernen, und durch Proteasen, die Einschnitte in dem Enzym verursachen. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression rekombinanter α -L-Iduronidase dazu, dass 50% des Enzyms sekretiert statt zum Lysosom transportiert werden (Zhao et al., J. Biol. Chem. 272: 22758–22765 (1997)). Somit wird rekombinante Iduronidase eine volle Anordnung an Sialinsäure- und Phosphatresten haben, was zu einem höheren Maß an Wasserlöslichkeit und geringerer Affinität für die Phenylsäule führt. Die gesteigerte Hydrophilie erlaubt es dem Enzym, unter nicht-denaturierenden Bedingungen eluiert zu werden, indem man Niedrigsalzlösungen von etwa 150–700 mM NaCl verwendet. Dieses Merkmal des rekombinanten Enzyms erlaubt es diesem, ohne die Verwendung von Detergentien in großem Maßstab gereinigt zu werden.

[0056] Rekombinante α -L-Iduronidase, die in einer chinesischen Hamster-Ovarialzelllinie (CHO-Zelllinie) überexprimiert worden war, wurde in einem 3-Schritt Säulenchromatographie-Verfahren bis nahezu zur Homogenität gereinigt. Die erste Säule beinhaltet einen Affinitätschromatographieschritt unter Verwendung von blauer Sepharose 6 FF. Das Eluat aus der blauen Sepharose 6 FF wird dann durch einen weiteren Affinitätschromatographieschritt unter Verwendung von Cu^{2+} chelierender Sepharose FF weiter gereinigt. Den endgültigen Schliff erhält das hochgradig gereinigte Enzym durch hydrophobe Interaktionschromatographie unter Verwendung von Phenyl-Sepharose High Performance (HP). Die allgemeine Ausbeute reicht von 45 bis 55%, und die

Reinheit des Endprodukts beträgt > 99%. Das Verfahren ist robust, reproduzierbar und größenmäßig auf die Herstellung im Großmaßstab einstellbar. Das gereinigte Enzym ist im Hinblick auf seine enzymatische Aktivität unter Verwendung eines fluoreszenzbasierten Substrats charakterisiert worden, ebenso seine funktionelle Aufnahme durch Fibroblastenzellen. Das Enzym ist außerdem auf Substratspezifität und auf sein Kohlenhydratprofil und das Profil der isoelektrischen Fokussierung (IEF) hin charakterisiert worden.

[0057] Besonders bevorzugte Ausführungsformen des Verfahrens zur Reinigung von α -L-Iduronidase gemäß der vorliegenden Erfindung zeichnen sich durch mehr als eine oder alle Optimierungen gemäß den folgenden spezifischen Ausführungsformen aus. Das Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung kann daher eine gereinigte α -L-Iduronidase mit den hier beschriebenen Eigenschaften bereitstellen.

Übersicht über das Reinigungsverfahren von α -L-Iduronidase



1. pH-Einstellung/Filtration: Der pH der gefilterten geernteten Flüssigkeit (HF) wird mit 1 M H_3PO_4 auf 5,3 eingestellt und dann durch einen 0,45 μ -Filter (z.B. Sartoclean, Sartorius) gefiltert.

2. Blaue Sepharose FF-Chromatographie: Dieser Affinitätschromatographieschritt dient dazu, Iduronidase einzufangen, um das Volumen zu reduzieren und um Iduronidase etwa sieben- bis zehnfach zu reinigen.

Ladungskapazität: 4 mg/ml (Gesamtprotein pro ml Harz)

Equilibrationpuffer: 10 mM NaPO_4 , pH 5,3

Waschpuffer: 400 mM NaCl, 10 mM NaPO_4 , pH 5,3

Elutionspuffer: 0,8 M NaCl, 10 mM NaPO_4 , pH 5,3

Regenerationpuffer: 2 M NaCl, 10 mM NaPO_4 , pH 5,3

Reinigungsgrad: 7–10-fach

Ausbeute: 70–85%

3. Cu⁺⁺ chelierende Sepharose FF-Chromatographie: Der Cu⁺⁺ chelierende Affinitätschromatographieschritt ist sehr effektiv, um einige kontaminierende CHO-Proteine zu entfernen. Die Einbeziehung von 10% Glycerol in alle Puffer scheint entscheidend wichtig für die quantitative Rückgewinnung von Iduronidase zu sein.

Ladekapazität: 2 mg/ml

Equilibrationpuffer: 1 M NaCl, 25 mM NaAc, pH 6,0, 10% Glycerol

Waschpuffer: 1 M NaCl, 25 mM NaAc, pH 4,0, 10% Glycerol

Elutionspuffer: 1 M NaCl, 25 mM NaAc, pH 3,7, 10% Glycerol

Regenerationpuffer: 1 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0

Reinigungsgrad: 2–5-fach

Ausbeute: 80%

4. Phenyl-Sepharose-HP-Chromatographie: Phenyl-Sepharose wird als letzter Schritt verwendet, um das Produkt weiter zu reinigen, und ebenso, um verbleibenden ausgewaschenen Cibacron Blau-Farbstoff und Cu⁺⁺-Ionen, die aus vorherigen Säulen mitgeschleppt wurden, zu reduzieren.

Ladekapazität: 1 mg/ml

Equilibrationpuffer: 2 M NaCl, 10 mM NaPO_4 , pH 5,7

Waschpuffer: 1,5 M NaCl, 10 mM NaPO₄, pH 5,7
 Elutionspuffer: 0,7 M NaCl, 10 mM NaPO₄, pH 5,7
 Regenerationspuffer: 0 M NaCl, 10 mM NaPO₄, pH 5,7
 Reinigungsgrad: 1,5-fach
 Ausbeute: 90%

5. Ultrafiltration (UF)/Diafiltration (DF)/Endformulierung: Die gereinigte Iduronidase wird konzentriert und in Formulierungspuffer (150 mM NaCl, 100 mM NaPO₄, pH 5,8) unter Verwendung eines Tangentialflussfiltrationssystems (TFF) (z.B. Sartocoon Slice von Sartorius) bis auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml diafiltriert. Das Enzym wird dann mittels Filterung durch einen 0,2-Mikron-Filter (z.B. Celluloseacat oder Polysulfon) sterilisiert und in sterile Phiolen abgefüllt.

6. Charakterisierung gereinigter Iduronidase: Analyse der Enzymreinheit unter Verwendung von SDS-PAGE, gefärbt mit Coomassie-Blau oder Silber und Western Blot-Analyse. Analyse der enzymatischen Aktivität unter Verwendung von 4MU-Sulfat als Substrat. Analyse der funktionellen Aufnahme unter Verwendung eines Fibroblastenzell-Assays. Analyse der Kohlenhydrate durch FACE. Analyse der IEF-Profile.

[0058] Für auf diese Weise gereinigtes Enzym ist gezeigt worden, dass es Mannose-6-Phosphatreste von hinreichender Menge an den Positionen 3 und 6 der N-gebundenen Zucker enthält, um eine Enzymaufnahme-affinität von weniger als 30 Units pro ml (weniger als 2 nM) an Enzym zu ergeben. Das Enzym ist im Wesentlichen korrigierend für Glykosaminoglykan-Speicherkrankheiten, die durch Iduronidase-Defizienz verursacht werden, und es besitzt innerhalb der Zellen eine Halbwertszeit von etwa 5 Tagen.

[0059] Frühere Reinigungsschemata für α -L-Iduronidase (Kakkis et al., Protein Expr. Purif. 5: 225–232 (1994); Kakkis et al., Biochem. Mol. Med. 58: 156–167 (1996); US-Patent Anmeldungen Nr. 09/078,209 und 09/170,977) erbrachten Reinheitsgrade zwischen 90% und unter 99%, was für eine langfristige Anwendung beim Menschen nicht optimal ist (siehe [Fig. 12](#)). Die Behandlung mit humaner rekombinanter α -L-Iduronidase mit einer Mindestreinheit von 97% war mit einigen klinischen Reaktionen assoziiert, spezifischen Quaddeln bei 5 Patienten und Komplementaktivierung bei 4 Patienten. Alle Patienten zeigten eine Reaktion gegenüber einem Protein, das eine Spurenverunreinigung der α -L-Iduronidase ist ([Fig. 2](#)). Da dieses Protein sowohl im Endprodukt als auch in dem serumfreien Überstand einer als Nullkontrolle dienenden CHO-Zelllinie vorkommt, rührt das fremde Protein am wahrscheinlichsten von den CHO-Zellen her. Die gewöhnlichen Proteine, die die klinische allergische Antwort zu aktivieren scheinen, sind etwa 60 kD bzw. 50 kD groß, was zu klein ist, um rekombinante humane Iduronidase zu sein. Vier Patienten entwickelten eine zumindest vorübergehende Immunreaktion gegenüber α -L-Iduronidase und ebenso gegenüber Wirtsproteinen aus den chinesischen Hamster-Ovarialzellen. Auch wenn das zur Behandlung von Patienten verwendete Enzym hochgradig gereinigt ist, ist klar, dass das Ausmaß der Reinigung wichtig ist, um die Immunantwort gegenüber Verunreinigungen zu reduzieren. [Fig. 2](#) (SDS-PAGE) und [Fig. 12](#) (CHOP-Assay) zeigen, dass α -L-Iduronidase, die über das Produktions-/Reinigungs-Schema der vorliegenden Erfindung hergestellt und gereinigt wird, ein höheres Ausmaß an Reinheit und ein geringeres Ausmaß an CHOP-Verunreinigung im Vergleich zu früheren Verfahren der Herstellung/Reinigung besitzt. Somit ist eine mehr als 97%ige Reinheit angemessen für den Gebrauch beim Patienten, wobei höhere Reinheitsgrade erstrebenswert und bevorzugt sind. Wie in [Fig. 12](#) gezeigt, erreicht das oben beschriebene, optimierte Reinigungsschema einen Reinheitsgrad, der bei über 99% liegt und bedeutender Weise chinesische Hamster-Ovarialzell-Wirtsproteine auf weniger als 1 Prozent reduziert, wie bestimmt durch den Test auf chinesisches Hamster-Ovarialprotein (CHOP).

[0060] Rekombinante α -L-Iduronidase stellt eine Enzymersatz-Therapie im Hundemodell von MPS 1 bereit. Dieses Hundemodell ist aufgrund einer genetischen Mutation defizient für α -L-Iduronidase und ist menschlichem MPS 1 ähnlich. Gereinigte, korrekt prozessierte α -L-Iduronidase wurde 11 Hunden intravenös verabreicht. Bei diesen Hunden, die für 0,5, 3, 6 oder 13 Monate mit wöchentlichen Dosen von 25.000 bis 125.000 Units pro kg behandelt wurden, wurde das Enzym in einer Vielzahl von Geweben aufgenommen und verminderte die lysosomale Speicherung in vielen Geweben. Die langfristige Behandlung der Erkrankung war verbunden mit klinischer Verbesserung bei Verhalten, Gelenksteifigkeit, Fell und Wachstum. Höhere Dosen der Therapie (125.000 Units pro Kilogramm pro Woche) resultierten in besserer Wirksamkeit, einschließlich einer Normalisierung der GAG-Exkretion im Urin zusätzlich zu einer schnelleren klinischen Verbesserung bei Verhalten, Gelenksteifigkeit und Fell.

[0061] Die Enzymtherapie resultierte selbst bei kleinen Dosen von 25.000 Units (0,1 mg/kg/Woche) in einer signifikanten Enzymverteilung auf einige Gewebe und Abnahmen der GAG-Speicherung. Bei Fortsetzung für über 1 Jahr waren einige klinische Wirkungen im Hinblick auf eine gesteigerte Aktivität, Größe und das allgemeine Gesundheitsbild erkennbar. Die Therapie bei dieser Dosis führte zu keiner Verbesserung bei anderen Geweben, die wichtige Stellen der Erkrankung in diesem Gesamtkomplex sind, wie etwa Knorpel oder Gehirn.

Höhere Dosen von 125.000 Units (0,5 mg/kg), verabreicht 5-mal über 2 Wochen, zeigen, dass eine verbesserte Gewebepenetration erreicht werden kann, und eine therapeutische Wirkung auf Gewebeniveau wurde in nur 2 Wochen erreicht. Studien bei dieser gesteigerten Dosis sind bei zwei Hunden für 15 Monate vervollständigt worden. Diese MPS I-Hunde zeigen eine signifikante klinische Verbesserung und wesentliche Abnahmen der GAG-Exkretion im Urin bis hinein in den normalen Bereich. Anders als bei einer Immunreaktion, die durch veränderte Verabreichungstechniken kontrolliert wird, hat die Enzymtherapie keine signifikante klinische oder biochemische Toxizität gezeigt. Die Enzymtherapie bei dieser höheren wöchentlichen Dosis ist wirksam beim Verbessern einiger klinischer Merkmale von MPS I und einer Verringerung des Speichers ohne signifikante Toxizität.

[0062] Es können Vektoren erstellt werden, die für α -L-Iduronidase codierende Nukleotidsequenzen enthalten, um so eine kontinuierliche oder regulierte Expression des Enzyms bereitzustellen. Zusätzlich kann der genetische Vektor, der für das Enzym codiert, so gestaltet werden, dass er stabil in das Genom der Zelle integriert wird, oder dass er nur transient vorhanden ist.

[0063] Nachdem die Erfindung beschrieben worden ist, werden die folgenden Beispiele dargestellt, um den Gegenstand der Erfindung veranschaulichend, nicht jedoch einschränkend zu erläutern.

BEISPIEL 1

Herstellung rekombinanter α -L-Iduronidase

[0064] Es können Standardtechniken, wie etwa diejenigen, die von Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1987)) beschrieben wurden, verwendet werden, um cDNA zu klonieren, die für humane α -L-Iduronidase codiert. Die zuvor klonierte humane α -L-Iduronidase-cDNA wurde (Invitrogen) als ein HindIII-XbaI-Fragment aus einem Bluescript KS-Subklon in PRCCMV subkloniert. Eine Intronkassette, abgeleitet von dem murinen Immunglobulin Cot-Intron zwischen den Exons 2 und 3, wurde konstruiert, indem man die Basen 788–1372 (Tucker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7684–7688 (1991)) von Klon pRIR14.5 (Kakkis et al., Nucleic Acids Res. 16: 7796 (1988)) einer PCR-Amplifikation unterzog. Die Kassette enthielt 136 bp des 3'-Endes von Exon 2 und 242 bp des 5'-Endes von Exon 3, die in der korrekt gespleißten cDNA verbleiben würden. Es sind in der codierenden Region der Intronkassette keine ATG-Sequenzen vorhanden. Die Intronkassette wurde in die HindIII-Stelle 5' zu der α -L-Iduronidase-cDNA kloniert. Das neo-Gen wurde durch Verdau mit XhoI, gefolgt von erneuter Zirkularisierung des Vektors zur Erzeugung von pCMVhIdu, deletiert.

[0065] Eine Phiole der Arbeitszellbank wird aufgetaut und in drei T225-Kolben in DME/F12 oder PF-CHO plus Zusätzen, plus 5% FBS und 500 μ g/ml G418, eingebracht. Nach 2 bis 5 Tagen werden die Zellen unter Verwendung von Trypsin-EDTA einer Passage in eine 1-Liter-Spinnerflasche im gleichen Medium für 2 bis 5 Tage unterzogen. Die Zellen werden dann für 2 bis 5 Tage auf zwei 3-Liter-Spinnerflaschen übertragen, gefolgt von vier 8-Liter-Spinnerflaschen für 2 bis 5 Tage. Das Impfmedium aus den 8-Liter-Spinnerflaschen wird dann zu zwei 110-Liter Applikon® Rührtank-Bioreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 80–90 Litern gegeben. Makroporöse Cellulose-Mikroträger werden auf 2 g pro Liter (160 g) mit PF-CHO oder DME/F12 plus Zusätzen, 5% FBS und 500 μ g/ml G418, bei einem Endvolumen von 80–90 Litern hinzugegeben. Das Gefäß wird durch einen Overhead-Antrieb mit einem Marine-Impeller gerührt. Die Kultur wird überwacht auf Bewegungsgeschwindigkeit, Temperatur und DO und wird mit pH-Sonden und über das Applikon®-Kontrollsystem mit einem PC-Interface kontrolliert. Die Parameter werden im Hinblick auf die eingestellten Punkte oder den eingestellten Bereich kontrolliert, 35–37°C in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, 40% Luftsättigung und pH 6,95, wobei eine Heizdecke, eine Sauerstoffeinspritzvorrichtung und eine Basispumpe verwendet werden. Die Kultur wird für 3 bis 5 Tage inkubiert, wobei die Kultur zu dieser Zeit aus der logarithmischen Wachstumsphase bei $1-3 \times 10^6$ Zellen pro ml heraustritt. Danach wird die Perfusion bei einer zunehmenden Rate mit PF-CHO-Medium (mit Standard-Modifikationen, JRH Biosciences) gestartet. Die ersten vier Tage der Sammlung (Bereich von 3–5 Tagen) werden als „Auswaschungen“ beiseite gelegt. Die Sammlung danach ist der Beginn des Produktionslaufs. Die Produktion läuft weiter mit Mediumwechseln von immerhin 2–3,5 Kulturvolumina pro Tag für 20–36 Tage. Die Kultur kann auf 40 Tage oder länger ausgedehnt werden. Die Kultur wird auf einer kontinuierlichen Basis auf Temperatur, pH und DO hin überwacht. Die Reinigung des Enzyms läuft ab wie oben beschrieben. Das gesammelte Produktionsmedium, das Iduronidase enthält, wird dann auf pH 5,3 angesäuert, durch einen 0,2-Mikron-Filter abfiltriert und unter Verwendung von Blau-Sepharose-Chromatographie gereinigt. Das gereinigte Enzym aus mehreren Runden der Blau-Sepharose-Chromatographie wird dann vereint und auf eine Kupfer chelierende Säule appliziert und mit Glycerol im Puffer bei pH 3,7 eluiert. Das Enzym wird auf dem sauren pH gehalten, um potentielle Viren zu inaktivieren. Das Kupfersäulen-Eluat wird dann auf pH 5,7 und 2 M NaCl

eingestellt und auf die Phenyl-Sepharosesäule geladen. Das Enzym wird bei 0,7 M NaCl eluiert. Das Eluat wird konzentriert und in einen Formulierungspuffer von 150 mM NaCl, 100 mM NaPO₄, pH 5,8 diafiltriert. Das Enzym wird durch einen 40 nM Filter filtriert, um potentielle Viren zu entfernen, und das Filtrat wird dann auf 0,001% Polysorbat 80 eingestellt. Das formulierte Enzym wird einer sterilen Masseneinfüllung in sterile Polyethylenbehälter unterzogen. Die Enzymmasse wird dann filtriert und in 5 cc Typ 1 Glasphiolen abgefüllt, die für injizierbare Pharmazeutika geeignet sind, mit einem Stöpsel versehen und mit einem Deckel verschlossen.

BEISPIEL 2

[0066] Für Bioreaktoren, die Einzelzellsuspensionen verwenden, wird die Animpfungseinheit hergestellt wie oben in BEISPIEL 1 beschrieben. Die Verwendung einer Einzelzellsuspension erleichtert die Bioreaktorbereitung und Animpfung. Der Bioreaktor wird mit den Zellen in DMEM/F12-Medium (25% des Reaktorvolumens) und modifiziertem JRH 325 (25% des Reaktorvolumens) angeimpft. Es wird Medium, das 50% des Arbeitsvolumens des Reaktors entspricht, über 48 Stunden hinzugegeben. Die Perfusion (und Ernte) wird gestartet, wenn die Zelldichte 1,0 e⁶ erreicht, und das Perfusionsmedium ist das gleiche wie oben beschrieben.

BEISPIEL 3

[0067] Eine kurzzeitige intravenöse Applikation von gereinigter humaner rekombinanter α -L-Iduronidase bei 9 MPS I-Hunden und 6 MPS I-Katzen hat eine signifikante Aufnahme des Enzyms bei einer Vielzahl von Geweben mit einer geschätzten 50%igen oder größeren Ausbeute in den Geweben 24 Stunden nach einer Einzeldosis gezeigt. Obwohl Leber und Milz die größten Mengen an Enzym aufnahmen und die beste pathologische Verbesserung zeigen, sind Verbesserungen der Pathologie und des Glykosaminoglycan-Gehaltes in vielen, nicht jedoch in allen Geweben beobachtet worden. Insbesondere Knorpel, Gehirn und Herzklappe zeigten keine signifikante Verbesserung. Die klinische Verbesserung wurde bei einem einzelnen Hund bei Langzeitbehandlung für 13 Monate beobachtet, jedoch sind andere Studien auf 6 Monate oder weniger begrenzt worden. Alle Hunde und die meisten Katzen, die rekombinantes humanes Enzym erhielten, entwickelten Antikörper gegen das humane Produkt. Die IgG-Antikörper sind vom Komplement-aktivierenden Typ (wahrscheinlich canines IgG-Äquivalent). Dieses Phänomen wird auch bei wenigstens 13% der mit Aglucerase behandelten Gaucher-Patienten beobachtet. Proteinurie ist bei einem Hund beobachtet worden, was auf eine Immunkomplex-Erkrankung bezogen werden könnte. Bei den anderen behandelten Tieren wurden keine weiteren Effekte der Antikörper beobachtet. Eine spezifische Toxizität wurde nicht beobachtet, und die klinischen Laborstudien (vollständige Blutauszählung, Elektrolyte, BLJN/Kreatinin, Leber-Enzyme, Urinanalyse) waren ansonsten normal.

[0068] Die Enzymtherapie selbst bei kleinen Dosen von 25.000 Units (0,1 mg/kg/Woche) resultierte in einer signifikanten Enzymverteilung auf einige Gewebe und Abnahmen der GAG-Speicherung. Bei Fortführung für über 1 Jahr waren signifikante klinische Effekte der Therapie hinsichtlich der Aktivität, Größe und des allgemeinen Gesundheitsbilds erkennbar. Die Therapie bei dieser Dosis führte zu keiner Verbesserung anderer Gewebe, die wichtige Stellen der Erkrankung bei diesem Gesamtkomplex sind, wie etwa bei Knorpel oder Gehirn. Höhere Dosen von 125.000 Units (0,5 mg/kg), verabreicht 5-mal über 2 Wochen, zeigten, dass eine verbesserte Gewebepenetration erreicht werden kann und dass ein therapeutischer Effekt auf Gewebeniveau in nur 2 Wochen erreicht wurde. Studien bei dieser gesteigerten Dosis laufen bei zwei Hunden seit sechs Monaten bis zum jetzigen Datum. Diese MPS I-Hunde zeigen signifikante klinische Verbesserungen und wesentliche Abnahmen der GAG-Exkretion im Urin bis hinein in den normalen Bereich. Anders als bei einer Immunreaktion, die über veränderte Verabreichungstechniken kontrolliert wird, zeigte die Enzymtherapie keine signifikante klinische oder biochemische Toxizität. Die Enzymtherapie bei dieser höheren Wochendosis ist wirksam beim Verbessern einiger klinischer Merkmale von MPS I und einer Verringerung der Speicher ohne signifikante Toxizität.

[0069] Die Ergebnisse dieser verschiedenen Studien bei MPS I-Hunden und einer Studie bei MPS I-Katzen zeigen, dass die humane rekombinante α -L-Iduronidase sicher ist. Obwohl diese gleichen Ergebnisse eine signifikante logische Grundlage dafür liefern, dass dieses rekombinante Enzym wirksam bei der Behandlung von α -L-Iduronidase-Defizienz sein sollte, sagen sie nicht den klinischen Nutzen oder die potentiellen immunologischen Risiken der Enzymtherapie beim Menschen vorher.

BEISPIEL 4

[0070] Die humane cDNA von α -L-Iduronidase sagt ein Protein von 653 Aminosäuren und ein erwartetes Molekulargewicht von 70.000 Dalton nach der Abspaltung des Signalpeptids voraus. Die Aminosäuresequenzierung offenbart Alanin 26 am N-Terminus, was ein erwartetes Protein von 629 Aminosäuren ergibt. Humane re-

kombinante α -L-Iduronidase besitzt ein Histidin an Position 8 des reifen Proteins. Die vorhergesagte Proteinsequenz umfasst sechs potentielle N-gebundene Oligosaccharid-Modifikationsstellen. Alle diese Stellen sind in dem rekombinanten Protein modifiziert. Für die dritte und sechste Stelle ist gezeigt worden, dass diese eine oder mehrere Mannose-6-Phosphat-Reste enthält, die für die hochaffine Aufnahme in Zellen verantwortlich sind.

[0071] Dieses Peptid entspricht den Aminosäuren 26–45 von humaner rekombinanter α -L-Iduronidase mit einem Alanin am N-Terminus und der folgenden Sequenz (SEQ ID NO: 2):

Ala-Glu-Ala-Pro-His-Leu-Val-His-Val-Asp-Ala-Ala-Arg-Ala-Leu-Trp-Pro-Leu-Arg-Arg

[0072] Das rekombinante Enzym besitzt infolge der Kohlenhydrat-Modifikationen ein scheinbares Molekulargewicht von 82.000 Dalton auf der SDS-PAGE. Gereinigte humane rekombinante α -L-Iduronidase ist durch die Proteinsequenzierungseinrichtung der UCLA sequenziert worden. Es ist bevorzugt, das rekombinante Enzym intravenös zu applizieren. Humane rekombinante α -L-Iduronidase wurde für die klinische Studie in 10 ml Polypropylen-Phiolen mit einer Konzentration von 100.000 bis 200.000 Units pro ml bereitgestellt. Die abschließliche Dosierungsform des bei der klinischen Studie verwendeten Enzyms beinhaltet humane rekombinante α -L-Iduronidase, normale Saline und 100 mM Phosphatpuffer bei pH 5,8. Diese werden in einem Beutel normaler Saline hergestellt. Polysorbat 80 bei einer Endkonzentration von 0,001% wurde zu der Formulierung hinzugegeben, um das Protein gegen Scherung zu stabilisieren, um dadurch eine Präzipitation in den Endprodukt-Phiolen zu verhindern.

Endgültige, derzeit in Gebrauch befindliche Phiolen-Formulierung:

<u>Komponente</u>	<u>Zusammensetzung</u>
α -L-Iduronidase	Abzielend auf 0,7 mg/ml oder 100 (neue) Units pro ml
Natriumchlorid-Lösung	150 mM
Natrium-Phosphatpuffer	100 mM, pH 5,8
Polysorbat 80	0,001%

Endgültige, für die Behandlung von Patienten verwendete Dosierungsform:

<u>Komponente</u>	<u>Zusammensetzung</u>
α -L-Iduronidase-Produkt	5-12-fache Verdünnung der Konzentration in der Phiole
Natriumchlorid-Lösung	50 mM Natriumphosphat-Puffer 100-250 cc IV Beutel
Humanes Albumin	1 mg/ml

BEISPIEL 5

Wirkungen der intravenösen Verabreichung von α -L-Iduronidase bei Patienten mit Mucopolysaccharidose I

[0073] Auf Basis von Studien der Klonierung von cDNA, codierend für α -L-Iduronidase (Scott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9695–99 (1991), Stoltzfus et al., J. Biol. Chem. 267: 6570–75 (1992)) und Tierstudien, die die Wirkungen von α -L-Iduronidase beim Reduzieren der lysosomalen Speicherung in vielen Geweben zeigen (Shull et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12937–41 (1994); Kakkis et al., Biochem. Mol. Med. 58: 156–67 (1996)), wurde eine 52-Wochen-Studie durchgeführt, um die Sicherheit und klinische Wirksamkeit der intravenösen Applikation von hochgradig gereinigter α -L-Iduronidase bei zehn Patienten mit Mucopolysaccharidose I (MPS I) zu bestimmen.

[0074] Rekombinante humane α -L-Iduronidase wurde hergestellt und auf über 97–99% gereinigt. Die Patienten zeigten die typischen klinischen Symptome der Erkrankung, und die Diagnose wurde durch die biochemische Bestimmung der α -L-Iduronidase-Defizienz in Leukozyten bestätigt.

[0075] Den Patienten wurde rekombinante humane α -L-Iduronidase (verdünnt in normaler Saline mit 0,1% humanem Serumalbumin) intravenös bei einer Dosis von 125.000 Units pro kg (Verwendung der ursprünglichen Assay- und Unit-Definition) verabreicht; 3.000 Units pro kg wurden im Verlauf der ersten Stunde verabreicht und 61.000 Units pro kg in jeder der folgenden zwei Stunden. Die Dosis von 125.000 Units pro kg entspricht 100 SI-Einheiten pro kg unter Verwendung des neuen Tests. Die Infusionen wurden bei Patienten, die Hypersensitivitätsreaktionen zeigten, auf bis zu 4–6 Stunden verlängert.

[0076] An der Basislinie sowie bei 6, 12, 26 und 52 Wochen in Abhängigkeit von der Bewertung durchliefen die Patienten Untersuchungen, einschließlich der Geschichte, körperlicher Untersuchungen durch Spezialisten, Echokardiographie, EKG, MRI, Polysomnographie (Wochen 0 und 26), Skelettüberwachung (Wochen 0, 26, 52), Messungen des Bewegungsbereichs, Hornhautphotographien und Hautbiopsie (Woche 0), um Fibroblastenkulturen für die Enzymbestimmung und Genotypisierung zu erstellen. Die Messungen des Bewegungsbereichs wurden mit einem Goniometer durchgeführt, und der maximale Aktivitätsbereich (beim Patienten initiiert) wurde für jede Bewegung aufgezeichnet. Die Schulterbeugung entspricht der Bewegung des Ellenbogens in anteriorer Richtung von der Körperseite aus, und die Ellbogen- und Knie-Streckung stellen die gerade Ausrichtung des Gelenks dar. Die Maße (Gradwerte) der Einschränkung stellen den Unterschied zwischen dem normalen Maximalbereich der Bewegung für das Alter und dem gemessenen Wert dar. Die Polysomnographie wurde gemäß den Richtlinien der American Thoracic Society durchgeführt, und Apnoe-Ereignisse (Aussetzen des oro-nasalen Luftflusses für 10 Sekunden oder mehr) Hypopnoe-Ereignisse (verringert oder oro-nasaler Luftfluss von 50% oder mehr mit Entsättigung von 2% oder mehr, oder Anzeichen von Erwachen), die Minuten unterhalb einer Sauerstoffsättigung von 89% und die Gesamtschlafzeit wurden gemäß den erforderlichen Standardmessungen aufgezeichnet. Aus diesen Daten wurde ein Apnoe/Hypopnoe-Index berechnet, indem man die Gesamtzahl an Apnoe- und Hypopnoe-Ereignissen durch die Anzahl der Schlafstunden dividiert. Biochemische Studien beinhalteten die Messung der Enzymaktivität in Leukozyten und Mundschleimhautabstrichen, Glycosaminoglycan-Spiegel im Urin und Tests auf Serumantikörper gegen rekombinante humane α -L-Iduronidase (ELISA und Western Blot). Die Bestimmung von Organvolumina erfolgte durch die Analyse von MRI-Digitalbilddaten unter Verwendung der „Advantage Windows Workstation“-Software von General Electric. Das Organvolumen wurde in Millilitern gemessen und unter der Annahme einer Dichte von 1 Gramm pro ml in Gewicht umgesetzt. Die Glycosaminoglycan-Exkretion im Urin wurde durch die Anpassung eines veröffentlichten Verfahrens bestimmt. Western Blots und ELISA-Assays auf Antikörper gegen rekombinante humane α -L-Iduronidase wurden mittels Standardverfahren durchgeführt. Uronsäuren und N-Sulfat von Glycosaminoglycanen aus dem Urin wurden durch die Orcinol-, Carbazol- und MBTH-Verfahren und durch elektrophoretische Auftrennungen analysiert.

[0077] Alle Patienten erhielten wöchentliche Infusionen mit rekombinanter humaner α -L-Iduronidase, die für 52 Wochen verabreicht wurden. Die mittlere Aktivität von α -L-Iduronidase in Leukozyten betrug 0,04 Units pro mg vor der Behandlung, und, wenn sie durchschnittlich 7 Tage nach einer Infusion gemessen wurde (d.h. unmittelbar vor der nächsten Infusion), 4,98 Units pro mg bzw. 15,0% des Normalwerts.

[0078] Die Enzymaktivität war in den Mundabstrichen vor der Behandlung nicht detektierbar, jedoch erreichte sie 7 Tage nach den Infusionen ein Niveau von 1 Prozent des Normalwerts.

[0079] Das Lebert Volumen nahm ausgehend von der Basislinie bei 9 Patienten um 19 bis 37 Prozent ab und bei einem Patienten nach 52 Wochen um 5 Prozent; die mittlere Abnahme betrug 25,0 Prozent ($n = 10$, $P < 0,001$). Nach 26 Wochen war die Lebergröße für das Körpergewicht und das Alter bei 8 Patienten normal ([Fig. 1](#)). Bei 2 Patienten (Patienten 6 und 9) mit der größten relativen Lebergröße an der Basislinie war die Lebergröße nach 52 Wochen nahezu normal (3,2 bzw. 3,3 Prozent des Körpergewichts). Die Milzgröße nahm bei 8 Patienten um 13 bis 42 Prozent gegenüber der Basislinie ab (mittlere Abnahme von 20 Prozent bei 10 Patienten, $P < 0,001$).

[0080] Die Exkretion von Glycosaminoglycan im Urin nahm nach 3 bis 4 Wochen rasch ab und war nach 8 bis 12 Wochen um 60–80 Prozent, bezogen auf die Basislinie, gefallen. Nach 52 Wochen betrug die mittlere Reduzierung 63 Prozent (Bandbreite: 53–74; $p < 0,001$). Acht von zehn Patienten zeigten eine 75%ige oder größere Reduktion der Basislinienmenge des im Urin vorhandenen Glycosaminoglycans, das die Obergrenze des Normalwerts für das Alter übersteigt. Die Ergebnisse wurden bestätigt durch Assays von Uronsäuren und N-Sulfat (eine Testspezies für Heparansulfat). Die Elektrophoresestudien an Urin detektierten eine signifikante Reduzierung bei der Exkretion von Heparansulfat und Dermatan-sulfat, jedoch blieb ein gewisses Übermaß bei der Exkretion von Dermatan-sulfat bei allen Patienten bestehen.

[0081] Die mittlere Höhe nahm um 6,0 cm (5,2 Prozent) bei den 6 präpubertären Patienten zu (Tabelle 2), und

die Geschwindigkeit ihres mittleren Größenwachstums steigerte sich von 2,8 cm/Jahr auf 5,2 cm/Jahr während der Behandlung ($P = 0,011$). Bei allen 10 Patienten nahm das mittlere Körpergewicht um 3,2 kg (8,8 Prozent) zu, und bei den 6 präpubertären Patienten betrug die mittlere Zunahme 4,2 kg (17,1 Prozent) (Tabelle 2). Bei diesen 6 Patienten nahm die mittlere Geschwindigkeit der Gewichtszunahme von 1,7 kg pro Jahr vor der Behandlung auf 3,8 kg pro Jahr während der Behandlung zu ($P = 0,04$).

[0082] Die Schulterbeugung (die den Ellbogen anterior bewegt) nahm bei 6 der 8 bewerteten Individuen im Bezug auf die Basislinie zu, mit einer mittleren Verbesserung für die rechte und linke Schulter von 28° bzw. 26° ($P < 0,002$; [Fig. 2](#)). Die Ellbogen- und Kniestreckung nahm bei den 10 Patienten um einen Mittelwert von $7,0^\circ$ ($P < 0,03$) bzw. $3,2^\circ$ ($P = 0,10$) zu ([Fig. 2](#)).

[0083] Die Analyse der Verbesserung bei den einzelnen Patienten zeigte, dass die am stärksten eingeschränkten Gelenke die größte Verbesserung aufwiesen. An der Basislinie beispielsweise konnten die Patienten 5, 9 und 10 ihre Schultern nicht über 100° hinaus beugen (den Ellbogen anterior bewegen), was nach der Behandlung um 21° bis 51° zunahm. In entsprechender Weise zeigten die Patienten 2 und 9 eine wesentliche Zunahme der Kniestreckung. Die Veränderungen im Größenbereich der Bewegung waren begleitet von durch die Patienten berichtete Zunahmen der physikalischen Aktivitäten, wie etwa, in der Lage zu sein, sich die Haare zu waschen, einen Hamburger normal zu halten, sich an Kletterbalken zu hängen und besser Sport betreiben zu können.

[0084] Sieben Patienten zeigten eine Abnahme der Apnoe- und Hypopnoe-Ereignisse von 155 auf 60 pro Nacht bei Behandlung (eine 61-prozentige Abnahme), mit einer Veränderung des mittleren Apnoe/Hypopnoe-Index (Gesamtzahl der Ereignisse pro Stunde) von 2,1 auf 1,0. Drei Patienten hatten klinisch signifikante Schlaf-Apnoe und alle drei verbesserten sich während der Behandlung. Bei Patient 2 nahm der Apnoe/Hypopnoe-Index von 4,5 an der Basislinie auf 0,4 nach 26 Wochen ab, und die Gesamtzeit der Sauerstoffsättigung nahm von 48 Minuten auf 1 Minute pro Nacht ab. Patient 6 benötigte aufgrund schwerer Entsättigung (61 Minuten unter 89 Prozent Sättigung mit kontinuierlichem positivem Atemwegsdruck bei 368 Minuten des Schlafs) eine nächtliche kontinuierliche positive Atemwegs-Drucktherapie vor der Behandlung; nach 52 Wochen jedoch tolerierte der Patient die Schlafstudie ohne CPAP und entwickelte einen mangelnden Sättigungszustand von unter 89 Prozent nur noch für 8 Minuten während 332 Minuten des Schlafs. Patient 9 hatte einen Apnoe/Hypopnoe-Index von 9,5, der sich nach 26 Wochen auf 4,0 verringerte. Patient 8 verschlechterte sich aus unklaren Gründen mit einem Apnoe/Hypopnoe-Index von 0,1, der auf 3,1 nach 26 Wochen und auf 9,3 nach 52 Wochen anstieg. Acht von zehn Patienten oder deren Familien berichteten über eine verbesserte Atmung, und 5 von 7 vermerkten eine ruhigere Atmung während der Nacht, verbesserte Schlafqualität und verminderte Schläfrigkeit am Tage.

[0085] Die funktionelle Klassifizierung gemäß der New York Heart Association wurde durch Serieninterviews mit den Patienten bestimmt. Alle 10 Patienten berichteten über eine Verbesserung um eine oder zwei Klassen, jedoch gab es keine signifikanten objektiven Daten aus echokardiographischen Studien, um einen direkten Nutzen für das Herz zu verifizieren. Die verbesserten funktionellen Werte könnten Verbesserungen bei anderen Aspekten der MPS I-Erkrankung statt bei der Herzfunktion widerspiegeln. Beim Vergleichen der Basislinie gegenüber einer Behandlung von 52 Wochen zeigte die Echokardiographie eine verringerte Trikuspidal-Regurgitation oder pulmonale Regurgitation bei 4 Patienten, jedoch zeigten 2 Patienten (Patienten 2 und 7) eine sich verschlechternde Mitralklappeninsuffizienz. An der Basislinie hatte Patient 6 Vorhofflattern und klinische Anzeichen von Herzschwäche, einschließlich Atemnot im Ruhezustand und peripherem Ödem. Nach 12 Wochen hatte er einen normalen Sinusrhythmus mit einem Block ersten Grades, und seine Atemnot im Ruhezustand und sein „Pitting-Ödem“ lösten sich.

[0086] Alle 10 Patienten berichteten über einen Mangel an Ausdauer und über Einschränkungen der täglichen Aktivitäten vor der Behandlung, jedoch wurde die Toleranz gegenüber Bewegungsanstrengung nicht formell getestet. Während der Behandlung zeigte sich bei allen Patienten Besserung, und nach 26 Wochen waren viele in der Lage, mehr zu gehen, zu laufen und Sport zu treiben. Die Patienten 3, 4 und 5 berichteten die Auflösung schwerer, außer Gefecht setzender Kopfschmerzen nach einer Behandlung für 6–12 Wochen.

[0087] Mehrere Patienten berichteten eine verringerte Photophobie oder Bindehautreizung. Die Sehschärfe verbesserte sich bei einem Patienten (20/1000 bis 20/200 auf einem Auge) und mäßig bei zwei anderen.

[0088] Die Ergebnisse dieser Studie zeigen an, dass die intravenöse Verabreichung der hochgradig gereinigten rekombinanten humanen α -L-Iduronidase der vorliegenden Erfindung in klinischer und biochemischer Verbesserung bei Patienten mit Mucopolysaccharidose I resultiert. Die Normalisierung der Lebergröße und die na-

hezu erreichte Normalisierung der Glykosaminoglykan-Exkretion im Urin stimmt überein mit Daten aus Studien an Hunden mit Mucopolysaccharidose I, die eine Leerung der Speicher in der Leber und eine verringerte Glykosaminoglykan-Exkretion im Urin in nur 2 Wochen zeigten.

[0089] Überempfindlichkeitsreaktionen gegen die Infusionen der rekombinanten humanen α -L-Iduronidase waren weniger schwer als aus Studien bei Hunden vorhergesagt. Obwohl bei einigen Patienten bedeutsam, ließ sich wiederkehrende Nesselsucht durch vorab erfolgende Medikation und Anpassungen der Infusionsrate in den Griff bekommen. Für α -L-Iduronidase spezifische Antikörper wurden bei 4 Patienten detektiert, mit gewöhnlich subklinischer Komplementaktivierung, und sowohl die Antikörper als auch die Komplementaktivierung nahmen mit der Zeit ab. Ähnliche, durch IgG vermittelte Immunantworten sind zuvor bei Patienten mit Gaucher-Krankheit, die mit Glucocerebrosidase behandelt wurden, festgestellt worden, obwohl die Ereignisse bei unseren Patienten häufiger waren. Mucopolysaccharidose I-Patienten mit einem Null-Genotyp könnten eine größere Immunreaktion als bei diesen 10 Patienten zeigen, von denen keiner Null war.

[0090] Somit kann rekombinante humane α -L-Iduronidase lysosomale Speicher verringern und einige Aspekte der klinischen Erkrankung bei Mucopolysaccharidose I verbessern.

[0091] Die Erfindung, ihre Art und Weise und das Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung sind nun in solch vollständigen, klaren, prägnanten und exakten Begriffen beschrieben worden, sodass jeder Fachmann auf dem Gebiet, zu dem die Erfindung gehört, befähigt wird, selbige herzustellen und zu verwenden. Es versteht sich, dass das Vorstehende bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beschreibt und dass Modifikationen daran vorgenommen werden können, ohne vom Schutzzumfang der vorliegenden Erfindung, wie er in den Ansprüchen dargestellt ist, abzuweichen. Um den Gegenstand, der als Erfindung angesehen wird, spezifisch zu benennen und eindeutig zu beanspruchen, beschließen die folgenden Ansprüche diesen Anmeldungstext.

SEQUENZPROTOKOLL

<110>BIOMARIN PHARMACEUTICALS
HARBOR-UCLA REI

<120>REKOMBINANTE ALPHA-L-IDURONISASE, DEREN HERSTELLUNGS- UND AUFREI-
NIGUNGSVERFAHREN, UND BEHANDLUNG VON DURCH DIESE HERVORGERUFENEN
MANGELERKRANKUNGEN

<130>00800005100PC00

<140>ZU BENENNEN

<141>ZU BENENNEN

<150>09/439,923

<151>1999-11-12

<160>2

<170>FastSEQ for Windows Version 3.0

<210>1

<211>6200

<212>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<221>CDS

<222>(1558)...(3510)

<400>1

gaeggatcgg	gagatctccc	gateccctat	ggtcgactct	cagtacaatc	tgctctgatg	60
cgcgatagtc	aagccagtat	ctgctccctg	cttggtgtgt	ggaggctcgt	gagtagtgcg	120
cgagcaaaa	ttaagctaca	acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	180
ctagggttag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	240
gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	300
tggaggttcg	cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgcg	tggctgaccg	cccaacgacc	360
cccgcccatc	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	420
attgacgtca	atgggtggac	tatttacggc	aaactgcca	cttggcagta	catcaagtgt	480
atcatatgca	aagtagcccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	540
atgccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtatttagtca	600
tcgctattac	catgggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatggggc	780
gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840
ctgcttaact	ggcttatcga	aattaatacg	actcactata	gggagaccca	agcttcgcag	900
aattccctgcg	gctgctacag	tgtgtccagc	gtcctgctg	gctgtgctga	gcgctggaac	960
agtggcgcat	cattcaagtg	cacagttacc	catcctgagt	ctggcacctt	aactggcaca	1020
attgccaaag	tcacaggtga	gctcagatgc	ataccaggac	attgtatgac	gttccctgct	1080
cacatgcctg	ctttcttctc	ataatacaga	tgctcaacta	actgctcatg	tccttatatc	1140
acagagggaa	attggagcta	tctgagggaac	tgcccagaag	ggaagggcag	aggggtcttg	1200
ctctccctgt	ctgagccata	actcttcttt	ctaccttcca	gtgaacacct	ccccacccca	1260
ggteccacctg	ctaccgcgcg	cgtcggagga	gctggccctg	aatgagctct	tgctccctgac	1320
atgcctgggtg	cgagctttca	accctaaaga	agtgtgtgtg	cgatggctgc	atggaaatga	1380
ggagctgtcc	ccagaaaagct	acctagtgtt	tgagccccta	aaggagccag	gcgaggggagc	1440

caccacctac	ctggtgacaa	gcgtgttgcg	tgtatcagct	gaaagcttga	tatcgaattc	1500										
cgaggcgga	accggcagtg	cagcccggaag	ccccgcagtc	cccagagcacg	cgtggcc atg	1560										
					Met											
					1											
cg	ccc	ctg	cgc	ccc	cgc	gcc	gcg	ctg	ctg	gcg	ctc	ctg	gcc	tcg	ctc	1608
Arg	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	
		5						10					15			
ctg	gcc	gcg	ccc	ccg	gtg	gcc	ccg	gcc	gag	gcc	ccg	cac	ctg	gtg	cat	1656
Leu	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Ala	Pro	His	Leu	Val	His	
		20						25				30				
gtg	gac	gcg	gcc	cgc	gcg	ctg	tgg	ccc	ctg	cgg	cgc	ttc	tgg	agg	agc	1704
Val	Asp	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Trp	Pro	Leu	Arg	Arg	Phe	Trp	Arg	Ser	
		35				40					45					
aca	ggc	ttc	tgc	ccc	ccg	ctg	cca	cac	agc	cag	gct	gac	cag	tac	gtg	1752
Thr	Gly	Phe	Cys	Pro	Pro	Leu	Pro	His	Ser	Gln	Ala	Asp	Gln	Tyr	Val	
						55				60					65	
ctc	agc	tgg	gac	cag	cag	ctc	aac	ctc	gcc	tat	gtg	ggc	gcc	gtc	cct	1800
Leu	Ser	Trp	Asp	Gln	Gln	Leu	Asn	Leu	Ala	Tyr	Val	Gly	Ala	Val	Pro	
				70					75					80		
cac	cgc	ggc	atc	aag	cag	gtc	cgg	acc	cac	tgg	ctg	ctg	gag	ctt	gtc	1848
His	Arg	Gly	Ile	Lys	Gln	Val	Arg	Thr	His	Trp	Leu	Leu	Glu	Leu	Val	
			85					90					95			
acc	acc	agg	ggg	tcc	act	gga	cgg	ggc	ctg	agc	tac	aac	ttc	acc	cac	1896
Thr	Thr	Arg	Gly	Ser	Thr	Gly	Arg	Gly	Leu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Thr	His	
		100					105					110				
ctg	gac	ggg	tac	ctg	gac	ctt	ctc	agg	gag	aac	cag	ctc	ggg	ttt	gag	1944
Leu	Asp	Gly	Tyr	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Phe	Glu	
		115				120					125					
ctg	atg	ggc	agc	gcc	tcg	ggc	cac	ttc	act	gac	ttt	gag	gac	aag	cag	1992
Leu	Met	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	His	Phe	Thr	Asp	Phe	Glu	Asp	Lys	Gln	
					135					140				145		
cag	gtg	ttt	gag	tgg	aag	gac	ttg	gtc	tcc	agc	ctg	gcc	agg	aga	tac	2040
Gln	Val	Phe	Glu	Trp	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Arg	Tyr	
				150					155					160		
atc	ggt	agg	tac	gga	ctg	gcg	cat	gtt	tcc	aag	tgg	aac	ttc	gag	acg	2088
Ile	Gly	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	His	Val	Ser	Lys	Trp	Asn	Phe	Glu	Thr	
			165					170					175			
tgg	aat	gag	cca	gac	cac	cac	gac	ttt	gac	aac	gtc	tcc	atg	acc	atg	2136
Trp	Asn	Glu	Pro	Asp	His	His	Asp	Phe	Asp	Asn	Val	Ser	Met	Thr	Met	
		180					185					190				
caa	ggc	ttc	ctg	aac	tac	tac	gat	gcc	tgc	tcg	gag					

gcc agc ccc gcc ctg cgg ctg gga ggc ccc ggc gac tcc ttc cac acc Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr 210 215 220 225	2232
cca ccg cga tcc ccg ctg agc tgg ggc ctc ctg cgc cac tgc cac gac Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp 230 235 240	2280
egt acc aac ttc ttc act ggg gag gcg ggc gtg cgg ctg gac tac atc Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile 245 250 255	2328
tcc ctc cac agg aag ggt gcg cgc agc tcc atc tcc atc ctg gag cag Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln 260 265 270	2376
gag aag gtc gtc gcg cag cag atc cgg cag ctc ttc ccc aag ttc gcg Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala 275 280 285	2424
gac acc ccc att tac aac gac gag gcg gac ccg ctg gtg ggc tgg tcc Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser 290 295 300 305	2472
ctg cca cag ccg tgg agg gcg gac gtg acc tac gcg gcc atg gtg gtg Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val Val 310 315 320	2520
cag gtc atc gcg cag cat cag aac ctg cta ctg gcc aac acc acc tcc Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr Ser 325 330 335	2568
gcc ttc ccc tac gcg ctc ctg agc aac gac aat gcc ttc ctg agc tac Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser Tyr 340 345 350	2616
cac ccg cac ccc ttc gcg cag cgc acg ctc acc gcg cgc ttc cag gtc His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val 355 360 365	2664
cac aac acc cgc ccg ccg cac gtg cag ctg ttg cgc aag ccg gtg ctc Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu 370 375 380 385	2712
acg gcc atg ggg ctg ctg gcg ctg ctg gat gag gag cag ctc tgg gcc Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp Ala 390 395 400	2760
gaa gtg tcg cag gcc ggg acc gtc ctg gac agc aac cac acg gtg ggc Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val Gly 405 410 415	2808
gtc ctg gcc agc gcc cac cgc ccc cag ggc ccg gcc gac gcc tgg cgc Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp Arg 420 425 430	2856
gcc gcg gtg ctg atc tac gcg agc gac gac acc cgc gcc cac ccc aac	2904

Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn 435 440 445	
agg agc gtc gcg gtg acc ctg cgg ctg cgc ggg gtg ccc ccc ggc ccg Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro 450 455 460 465	2952
ggc ctg gtc tac gtc acg cgc tac ctg gac aac ggg ctc tgc agc ccc Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro 470 475 480	3000
gac ggc gag tgg cgg cgc ctg ggc cgg ccc gtc ttc ccc acg gca gag Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala Glu 485 490 495	3048
cag ttc cgg cgc tag cgc gcg gct gag gac ccg gtg gcc gcg gcg ccc Gln Phe Arg Arg * Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala Pro 500 505 510	3096
agg ccc tta ccc gcc ggc ggc cgc ctg agg ctg cgc ccc gcg ctg cgg Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Arg Leu Arg Pro Ala Leu Arg 515 520 525	3144
ctg ccg tgc ctt ttg ctg gtg cac gtg tgt gcg cgc ccc gag aag ccg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro 530 535 540	3192
ccc ggg cag gtc acg cgg ctc cgc gcc ctg ccc ctg acc caa ggg cag Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln 545 550 555 560	3240
ctg gtt ctg gtc tgg tgc gat gaa cac gtg ggc tcc aag tgc ctg tgg Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu Trp 565 570 575	3288
aca tac gag atc cag ttc tct cag gac ggt aag gcg tac acc ccg gtc Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro Val 580 585 590	3336
agg agg aag cca tgc acc ttc aac ctc ttt gtg ttc agc cca gac aca Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr 595 600 605	3384
ggc gct gtc tct ggc tcc tac cga gtt cga gcc ctg gac tac tgg gcc Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala 610 615 620	3432
cga cca ggc ccc ttc tgc gac cct gtg ccg tac ctg gag gtc cct gtg Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro Val 625 630 635 640	3480
cca aga ggg ccc cca tcc ccg ggc aat cca tgagcctgtg ctgagcccca Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro 645 650	3530
gtgggttgca cctccaccgg cagtcagcga gctggggctg cactgtgccc atgetgcect cccatcacc cctttgcaat atatttttat attttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3590 3650

```

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aattcctgca 3710
gcccggggga tccactagtt ctagagggcc cgttttaaacc cgctgatcag cctcgactgt 3770
gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctccccc gtgccttcct tgaccctgga 3830
aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag 3890
taggtgtcat totattctgg ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga 3950
agacaatago aggcattgctg gggatgcggt gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac 4010
cagctggggc tcgagagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 4070
tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggggt 4130
gcctaataag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtgc 4190
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttg 4250
cgtattgggg gctcttcgcg ttctctcgct actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 4310
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat 4370
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 4430
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia aaatcgacgc 4490
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga 4550
agctccctcg tgcgctctcc tgttcggacc ctgcccgtta ccggatacct gtccgccttt 4610
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 4670
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 4730
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aaacccggtaa gacacgactt atcgccactg 4790
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc tacagagttc 4850
ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 4910
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 4970
gctggttagc gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 5030
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 5090
taagggaatt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 5150
aaatgaagtt ttaaataaat ctaaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttacca 5210
tgcttaatac gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc 5270
tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggtt taccatctgg cccagtgc 5330
gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca 5390
gccggaaggc ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt 5450
aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt 5510
gccattgcta caggcatcgt ggtgtcaogc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 5570
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc 5630
tcttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggcgg cagtgttatc actcatgggt 5690
atggcagcac tgcataattc tottactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 5750
ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 5810
ccggcgctca tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 5870
ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 5930
atgtaaccca ctctgacacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 5990
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 6050
tggtgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 6110
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg gggtccgcgc 6170
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc 6200

```

<210> 2

<211> 650

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1          5          10          15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20          25          30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35          40          45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

```

Ala Val
 80
 Leu Leu
 5
 Phe Thr

 Gly Phe

 Asp Lys

 Arg Arg
 160
 Phe Glu
 175
 Met Thr

 Leu Arg

 Phe His

 Cys His
 240
 Asp Tyr
 255
 Leu Glu

 Lys Phe
 .
 Gly Trp

 Met Val
 320
 Thr Thr
 335
 Leu Ser

 Phe Gln

 Pro Val

 Leu Trp
 400
 Thr Val
 415
 Ala Trp

 His Pro

 Pro Gly

 Cys Ser
 480
 Thr Ala
 495
 Ala Pro

Arg	Pro	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Pro	Ala	Leu	Arg				
		515					520					525							
Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	His	Val	Cys	Ala	Arg	Pro	Glu	Lys	Pro				
		530					535					540							
Pro	Gly	Gln	Val	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gln	Gly	Gln				
545						550					555				560				
Leu	Val	Leu	Val	Trp	Ser	Asp	Glu	His	Val	Gly	Ser	Lys	Cys	Leu	Trp				
				565					570					575					
Thr	Tyr	Glu	Ile	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	Ala	Tyr	Thr	Pro	Val				
			580					585					590						
Ser	Arg	Lys	Pro	Ser	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Thr				
		595					600					605							
Gly	Ala	Val	Ser	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Arg	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Ala				
		610				615					620								
Arg	Pro	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Pro	Tyr	Leu	Glu	Val	Pro	Val				
625					630					635					640				
Pro	Arg	Gly	Pro	Pro	Ser	Pro	Gly	Asn	Pro										
				645				650											

Patentansprüche

1. Verfahren zum Reinigen eines rekombinanten α -L-Iduronidaseenzym oder biologisch aktiver Fragmente oder einer Mutante davon auf eine Reinheit von gleich oder größer als etwa 99%, welches die folgenden Stufen umfaßt:

- Ernten und Filtrieren einer Flüssigkeit, erhalten aus einer Kultur von Zellen, die mit Nukleinsäuren, die die rekombinante α -L-Iduronidase codieren, transformiert wurden,
- Einstellen des pH-Werts der Flüssigkeit auf einen sauren pH-Wert, gefolgt von Filtration durch einen 0,2 Mikrometer bis 0,54 Mikrometer Filter,
- Leiten der Flüssigkeit durch eine blaue Sepharose-FF-Säule, um die rekombinante α -L-Iduronidase einzufangen,
- Leiten des Eluats durch eine Kupfer chelierende Sepharosesäule, um kontaminierende Proteine zu entfernen,
- Leiten des Eluats durch eine Phenyl-Sepharosesäule, um verbleibenden herausgelösten Cibacron Blau-Farbstoff und von vorherigen Säulen übertragene Kupferionen zu reduzieren, und
- Konzentrieren und Diafiltrieren der daraus eluierten, gereinigten rekombinanten α -L-Iduronidase.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die blaue Sepharose-FF-Säule verwendet wird, um die rekombinante α -L-Iduronidase sieben- bis zehnfach zu reinigen.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren die Verwendung von 10% Glycerol in allen Puffern umfaßt, um die mengenmäßige Gewinnung der α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon zu steigern.

4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Stufe der Kupfer chelierenden Sepharose auf einer Kupfer chelierenden Sepharose-FF-Matrix ausgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Stufe der Phenyl-Sepharosesäule auf einer Phenyl-Sepharose-Hochleistungschromatographiematrix ausgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon eine spezifische Aktivität von mehr als 240.000 Einheiten pro Milligramm Protein aufweist.

7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon einen oder mehrere Mannose-6-phosphat-Reste umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon einen an Position 3 angebundenen Mannose-6-phosphat-Rest und einen an Position 6 an-

gebundenen Mannose-6-phosphat-Rest umfaßt.

9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die gereinigte rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon innerhalb einer Zelle eine Halbwertszeit von etwa 5 Tagen hat.

10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Kultur von Zellen eine Kultur von CHO-Zellen ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Kultur von CHO-Zellen eine Kultur von CHO-Zellen der Zelllinie 2.131 ist.

12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Zellen in einem proteinfreien Kulturmedium mit einem pH-Wert zwischen 6,8 und 7,0 kultiviert werden, wobei das Medium mit 7,6 mg/l Thymidin, 13,6 mg/l Hypoxanthin, 375 μ g/ml G418 und 5% fötalem Rinderserum ergänzt ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Zellen zur Konfluenz mit einer Dichte zwischen $2,0 \times 10^5$ bis $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml gezüchtet werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Medium der Zellen bei Konfluenz durch kontinuierliche Perfusion geerntet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die kontinuierliche Perfusion das Austauschen von zwischen 2 bis 3,5 Kulturvolumen des Mediums über 24 Stunden umfaßt.

16. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Erzeugung der rekombinanten α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon durch Ergänzen des Mediums mit Natriumbutyrat für 12 Stunden zum Induzieren der Genexpression von α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon gefördert wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Natriumbutyrat 12 Stunden nach der ersten Induktion mit Natriumbutyrat aus dem Medium entfernt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Erzeugung der rekombinanten α -L-Iduronidase oder des Fragments oder der Mutante davon während eines 21-tägigen Erzeugungszeitraums mit Natriumbutyrat alle 48 Stunden erneut ausgelöst wird.

19. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die rekombinante α -L-Iduronidase oder das Fragment oder die Mutante davon die Aminosäuresequenz der Reste 26 bis 653 von SEQ ID NO: 2 umfaßt.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die rekombinante α -L-Iduronidase eine menschliche α -L-Iduronidase von SEQ ID NO: 2 ist.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG CCGCATAGTT

      80      90      100      110      120      130      140
      *      *      *      *      *      *      *
AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAT TTAAGCTACA

      150      160      170      180      190      200      210
      *      *      *      *      *      *      *
ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTCG CTTGCTTCGG

      220      230      240      250      260      270      280
      *      *      *      *      *      *      *
ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC

      290      300      310      320      330      340      350
      *      *      *      *      *      *      *
ATTAGTTCAT AGCCCATATA TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG

      360      370      380      390      400      410      420
      *      *      *      *      *      *      *
CCCACGACCC CCCGCCCAT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC

      430      440      450      460      470      480      490
      *      *      *      *      *      *      *
ATTGACGTCA ATGGGTGGAC TATTTACGGT AACTGCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC

      500      510      520      530      540      550      560
      *      *      *      *      *      *      *
AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA CATGACCCTA

      570      580      590      600      610      620      630
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTCGC

      640      650      660      670      680      690      700
      *      *      *      *      *      *      *
AGTACATCAA TGGGCGTGGG TAGCGGTTTG ACTCAGGGG ATTTCCAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA

      710      720      730      740      750      760      770
      *      *      *      *      *      *      *
TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGAATTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG

      780      790      800      810      820      830      840
      *      *      *      *      *      *      *
CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATTA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA

      850      860      870      880      890      900      910
      *      *      *      *      *      *      *
CTGCTTAACT GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGTAGACCCA AGCTTCGCAG AATTCCTGCG

      920      930      940      950      960      970      980
      *      *      *      *      *      *      *
GCTGCTACAG TGTGTCCAGC GTCCTGCCTG GCTGTGCTGA GUGCTGGAAC AGTGCCGCAT CATTCAAGTG

      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *      *      *
CACAGTTACC CATCCTGAGT CTGGCACCTT AACTGGCACA ATTGCCAARG TCACAGGTGA GCTCAGATGC

```

Figur 1A

```

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
      *      *      *      *      *      *      *
ATACCAGGAC ATTGTATGAC GTTCCCTGCT CACATGCCTG CTTTCTTCCT ATAATACAGA TGCTCAACTA

      1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190
      *      *      *      *      *      *      *
ACTGCTCATG TCCTTATATC ACAGAGGGAA ATTGGAGCTA TCTGAGGAAC TGCCCAGAAG GGAAGGGCAG

      1200      1210      1220      1230      1240      1250      1260
      *      *      *      *      *      *      *
AGGGGTCTTG CTCTCCTTGT CTGAGCCATA ACTCTTCTTT CTACCTTCCA GTGAACACCT TCCCACCCCA

      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCACCTG CTACCGCCGC CGTCGGAGGA GCTGGCCCTG AATGAGCTCT TGTCCCTGAC ATGCCTGGTG

      1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
      *      *      *      *      *      *      *
CGAGCTTTCA ACCCTAAAGA AGTGCTGGTG CGATGGCTGC ATGGAATGA GGAGCTGTCC CCAGAAAGCT

      1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
      *      *      *      *      *      *      *
ACCTAGTGTG TGAGCCCCCTA AAGGAGCCAG GCGAGGGAGC CACCACCTAC CTGGTGACAA GCGTGTTGCG

      1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
      *      *      *      *      *      *      *
TGTATCAGCT GAAAGCTTGA TATCGAATC CGGAGGCGGA ACCGGCAGTG CAGCCCGAAG CCCCAGCAGT

      1550      1560      1570      1580      1590
      *      *      *      *      *
CCCCGAGCAG CGTGGCC ATG CGT CCC CTG CGC CCC CGC GCC GCG CTG CTG GCG CTC CTG
      Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu>
      _a_a_a_a_a_a_a_a_ORF RF[1] _a_a_a_a_a_a_a_a>

1600      1610      1620      1630      1640      1650
      *      *      *      *      *      *
GCC TCG CTC CTG GCC GCG CCC CCG GTG GCC CCG GCC GAG GCC CCG CAC CTG GTG CAT
      Ala Ser Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val His>
      _a_a_a_a_a_a_a_a_ORF RF[1] _a_a_a_a_a_a_a_a>

      1660      1670      1680      1690      1700      1710
      *      *      *      *      *      *
GTG GAC GCG GCC CGC GCG CTG TGG CCC CTG CGG CGC TTC TGG AGG AGC ACA GGC TTC
      Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe>
      _a_a_a_a_a_a_a_a_ORF RF[1] _a_a_a_a_a_a_a_a>

      1720      1730      1740      1750      1760      1770
      *      *      *      *      *      *
TGC CCC CCG CTG CCA CAC AGC CAG GCT GAC TAC GTC CTC AGC TGG GAC CAG CAG
      Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln>
      _a_a_a_a_a_a_a_a_ORF RF[1] _a_a_a_a_a_a_a_a>

      1780      1790      1800      1810      1820
      *      *      *      *      *
CTC AAC CTC GCC TAT GTG GGC GCC GTC CCT CAC CGC GGC ATC AAG CAG GTC CCG ACC
      Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr>
      _a_a_a_a_a_a_a_a_ORF RF[1] _a_a_a_a_a_a_a_a>

1830      1840      1850      1860      1870      1880
      *      *      *      *      *      *
CAC TGG CTG CTG GAG CTT GTC ACC ACC AGG GCG TCC ACT GGA CGG GGC CTG AGC TAC
      His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr>

```


Figur 1E

```

AAAAAAAAA AAAAAAAAAG AATTCCTGCA GCCCGGGGGA TCCACTAGTT CTAGAGGGCC CGTTTAAACC
      3760      3770      3780      3790      3800      3810      3820
      *      *      *      *      *      *      *
CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC GTGCCCTCCT
      3830      3840      3850      3860      3870      3880      3890
      *      *      *      *      *      *      *
TGACCCCTGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATCGC ATTGCTCTGAG
      3900      3910      3920      3930      3940      3950      3960
      *      *      *      *      *      *      *
TAGGTGTCAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC
      3970      3980      3990      4000      4010      4020      4030
      *      *      *      *      *      *      *
AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGAGAGCTT
      4040      4050      4060      4070      4080      4090      4100
      *      *      *      *      *      *      *
GGCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTCCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATCCACA CAACATACGA
      4110      4120      4130      4140      4150      4160      4170
      *      *      *      *      *      *      *
GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAAAT GCGTTCGGCT
      4180      4190      4200      4210      4220      4230      4240
      *      *      *      *      *      *      *
CACTGCCCGC TTCAGTCTG GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG
      4250      4260      4270      4280      4290      4300      4310
      *      *      *      *      *      *      *
AGCGGGTTTG CGTATTGGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TCGGCTCGGT CGTTCGGCTG
      4320      4330      4340      4350      4360      4370      4380
      *      *      *      *      *      *      *
CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGCGG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
      4390      4400      4410      4420      4430      4440      4450
      *      *      *      *      *      *      *
AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTCCA
      4460      4470      4480      4490      4500      4510      4520
      *      *      *      *      *      *      *
TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA
      4530      4540      4550      4560      4570      4580      4590
      *      *      *      *      *      *      *
CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA
      4600      4610      4620      4630      4640      4650      4660
      *      *      *      *      *      *      *
CCGGATACCT GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAA TGCTCAGCT GTAGGTATCT
      4670      4680      4690      4700      4710      4720      4730
      *      *      *      *      *      *      *
CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
      4740      4750      4760      4770      4780      4790      4800
      *      *      *      *      *      *      *
GCCTTATCCG GTAACATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCACGAGCCA

```

Figur 1F

```

      4810      4820      4830      4840      4850      4860      4870
      *      *      *      *      *      *      *
CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA

      4880      4890      4900      4910      4920      4930      4940
      *      *      *      *      *      *      *
CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT

      4950      4960      4970      4980      4990      5000      5010
      *      *      *      *      *      *      *
GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTGTGCAAG CAGCAGATTA

      5020      5030      5040      5050      5060      5070      5080
      *      *      *      *      *      *      *
CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA

      5090      5100      5110      5120      5130      5140      5150
      *      *      *      *      *      *      *
AAACTCACGT TAAGGGATT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA

      5160      5170      5180      5190      5200      5210      5220
      *      *      *      *      *      *      *
AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA

      5230      5240      5250      5260      5270      5280      5290
      *      *      *      *      *      *      *
GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTCATC CATAGTTGCC TGAATCCCGG TCGTGTAGAT

      5300      5310      5320      5330      5340      5350      5360
      *      *      *      *      *      *      *
AACTACGATA CGGAGGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC

      5370      5380      5390      5400      5410      5420      5430
      *      *      *      *      *      *      *
GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT GCAACTTTAT

      5440      5450      5460      5470      5480      5490      5500
      *      *      *      *      *      *      *
CGGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTGCGG GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG

      5510      5520      5530      5540      5550      5560      5570
      *      *      *      *      *      *      *
CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC

      5580      5590      5600      5610      5620      5630      5640
      *      *      *      *      *      *      *
GGTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC

      5650      5660      5670      5680      5690      5700      5710
      *      *      *      *      *      *      *
CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC

      5720      5730      5740      5750      5760      5770      5780
      *      *      *      *      *      *      *
TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA

      5790      5800      5810      5820      5830      5840      5850
      *      *      *      *      *      *      *
TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA

      5860      5870      5880      5890      5900      5910      5920
      *      *      *      *      *      *      *

```

Figur 1G

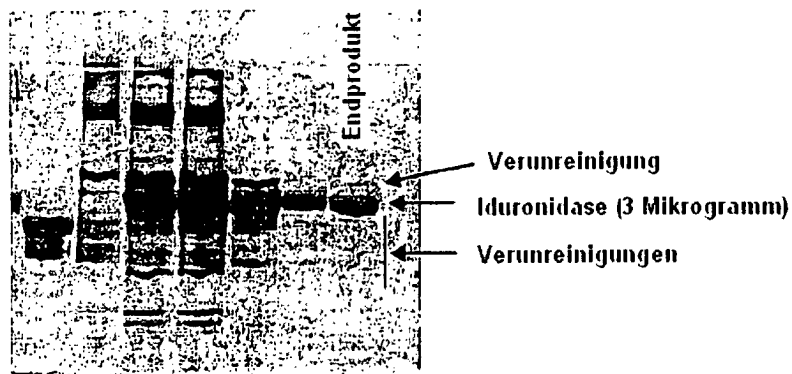
```

CTTTAAAAGT GCTCCTCATT GGAAAACGTT CTTGCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
      5930      5940      5950      5960      5970      5980      5990
      *      *      *      *      *      *      *
ATCCAGTTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TACTTTTAC CAGCGTTTCT
      6000      6010      6020      6030      6040      6050      6060
      *      *      *      *      *      *      *
GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGAATAC
      6070      6080      6090      6100      6110      6120      6130
      *      *      *      *      *      *      *
TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
      6140      6150      6160      6170      6180      6190      6200
      *      *      *      *      *      *      *
TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC

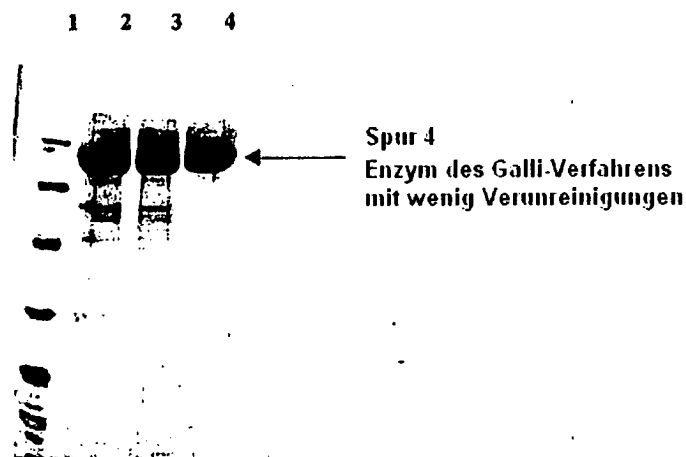
```

FIGUR 2. SDS-POLYACRYLAMIDGELE, DIE VERBESSERUNGEN DER REINHEIT ZEIGEN

Gel, das das von Kakkis et al. (1994) veröffentlichte Reinigungsverfahren verwendet

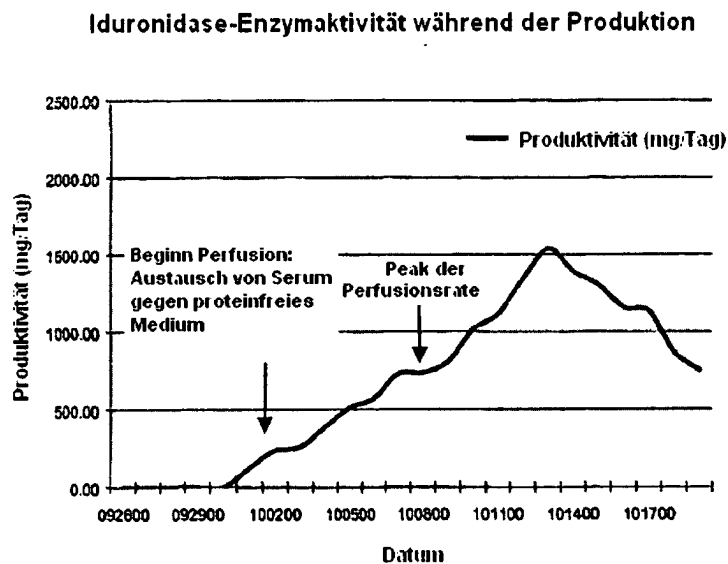


Gel, das das in dieser Anmeldung enthaltene neue Galli-Verfahren verwendet

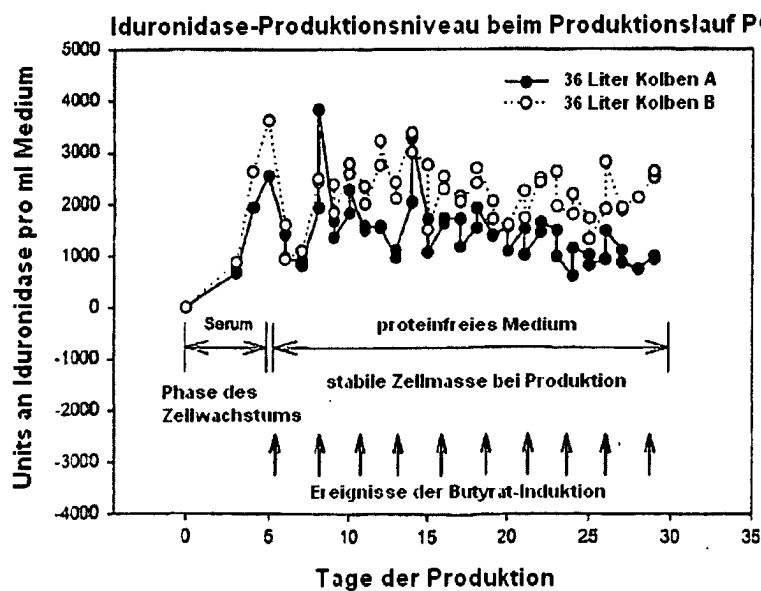


1. Molekulargewichtsmarker
2. Früheres Verfahren Carson (unveröffentl.), Charge 2000C9001, Referenz reduziert (7.5 µg)
3. Selbe Charge 2000C9001, Referenz reduziert (5.0 µg)
4. Enzym des Galli-Verfahrens, Charge P10006 (5.0 µg)

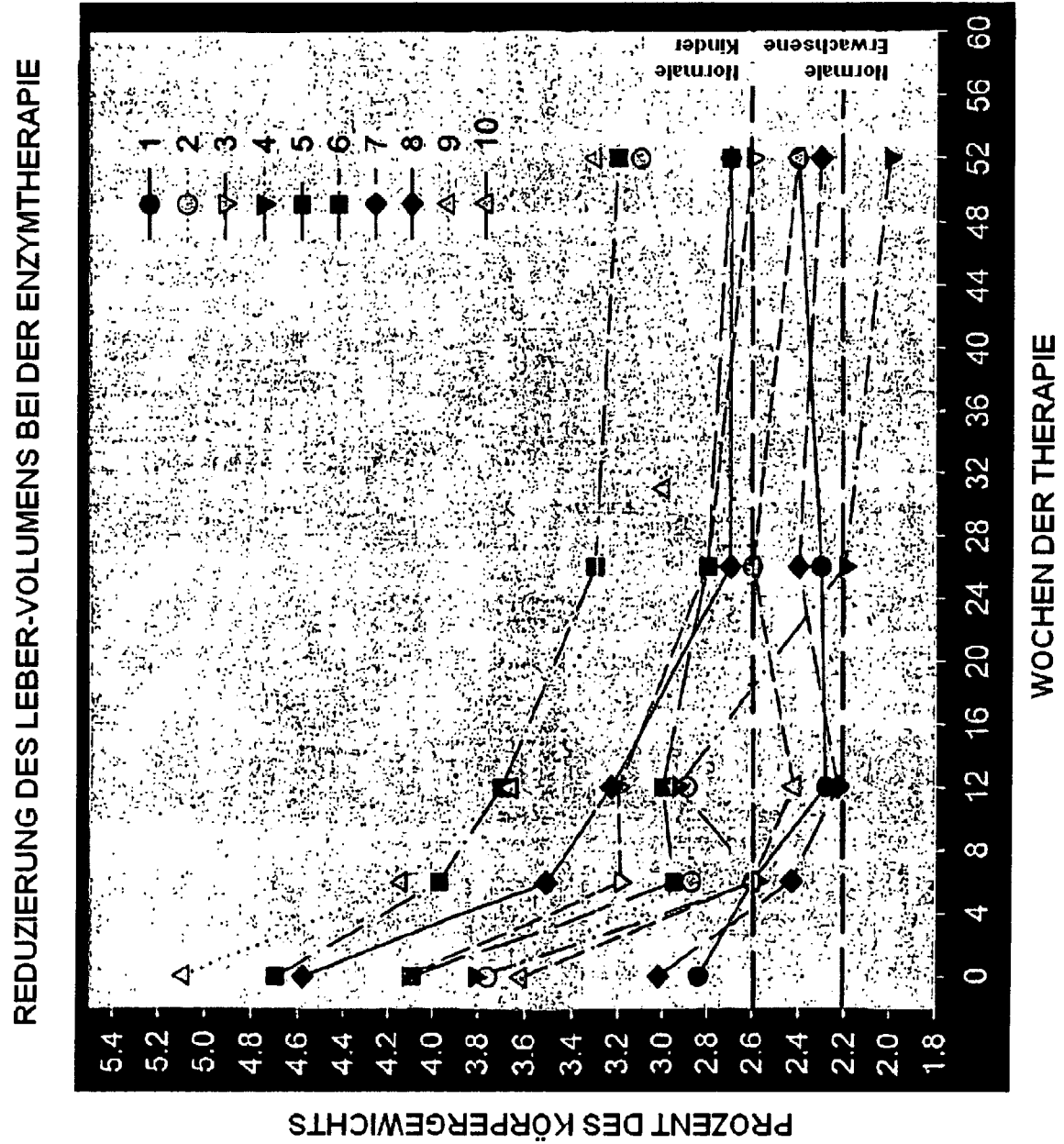
FIGUR 3A. IDURONIDASE-PRODUKTION UNTER VERWENDUNG DES GALLI-VERFAHRENS



FIGUR 3B. IDURONIDASE-PRODUKTION UNTER VERWENDUNG VON BUTYRAT-INDUKTION

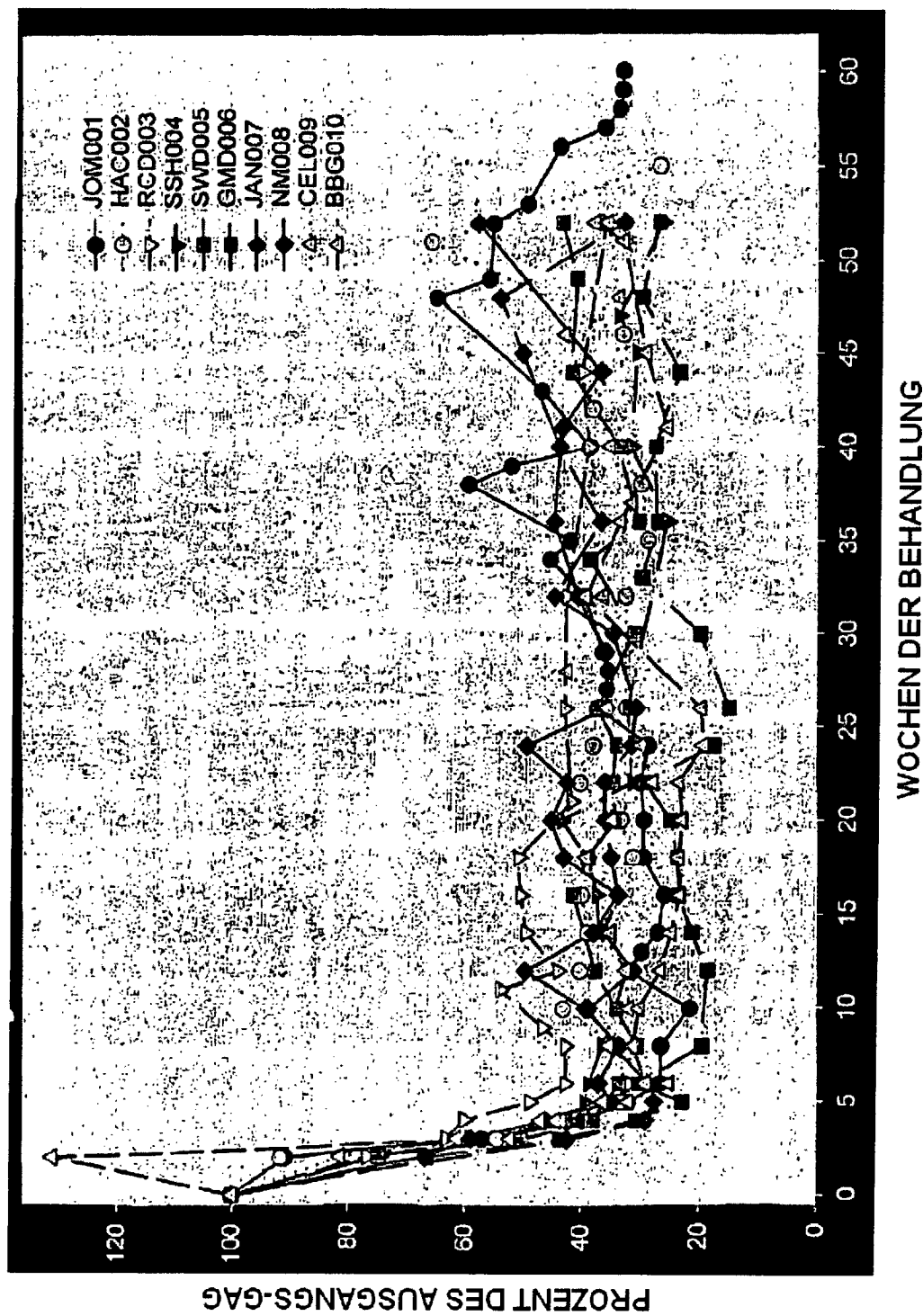


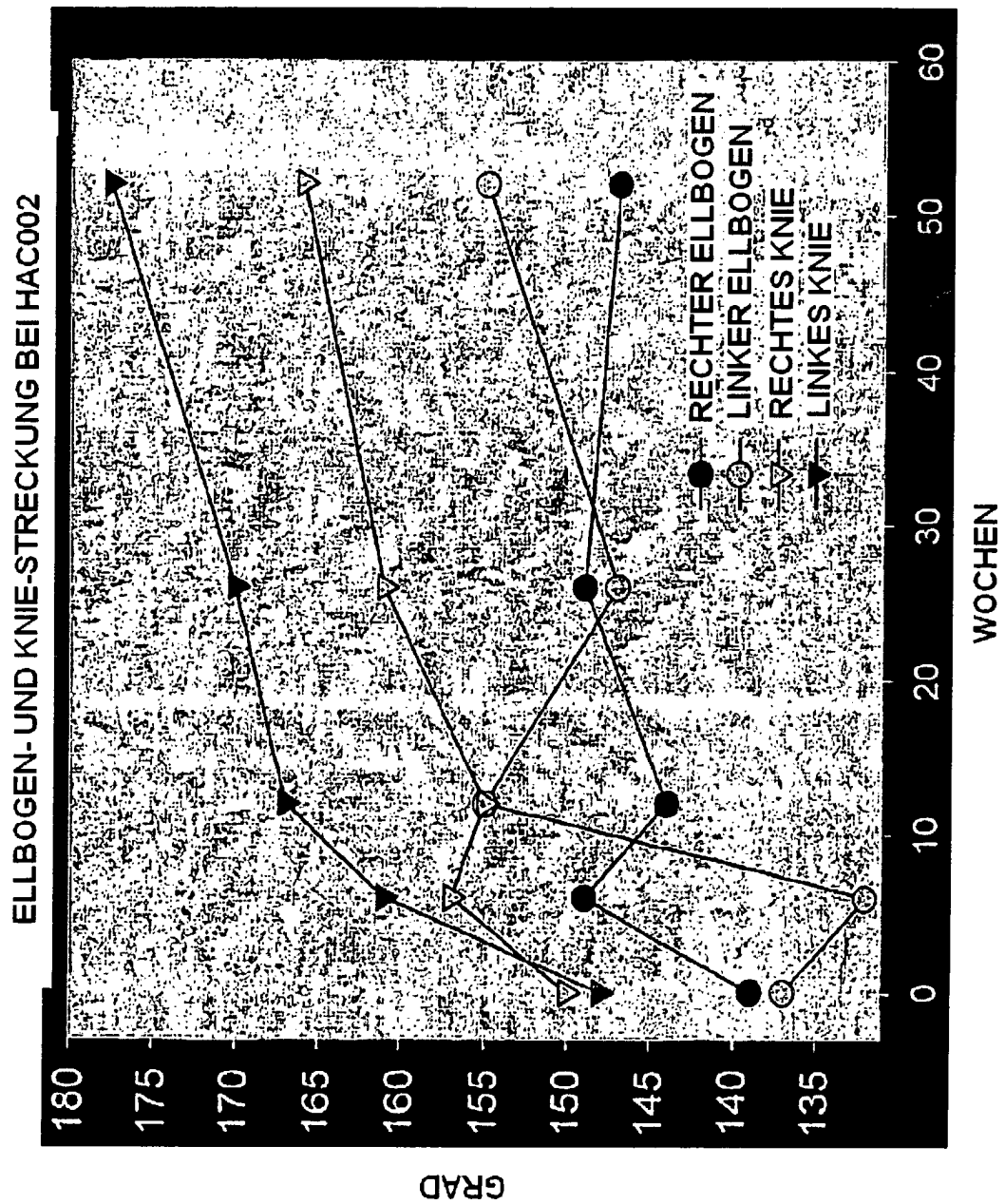
Figur 4



Figur 5

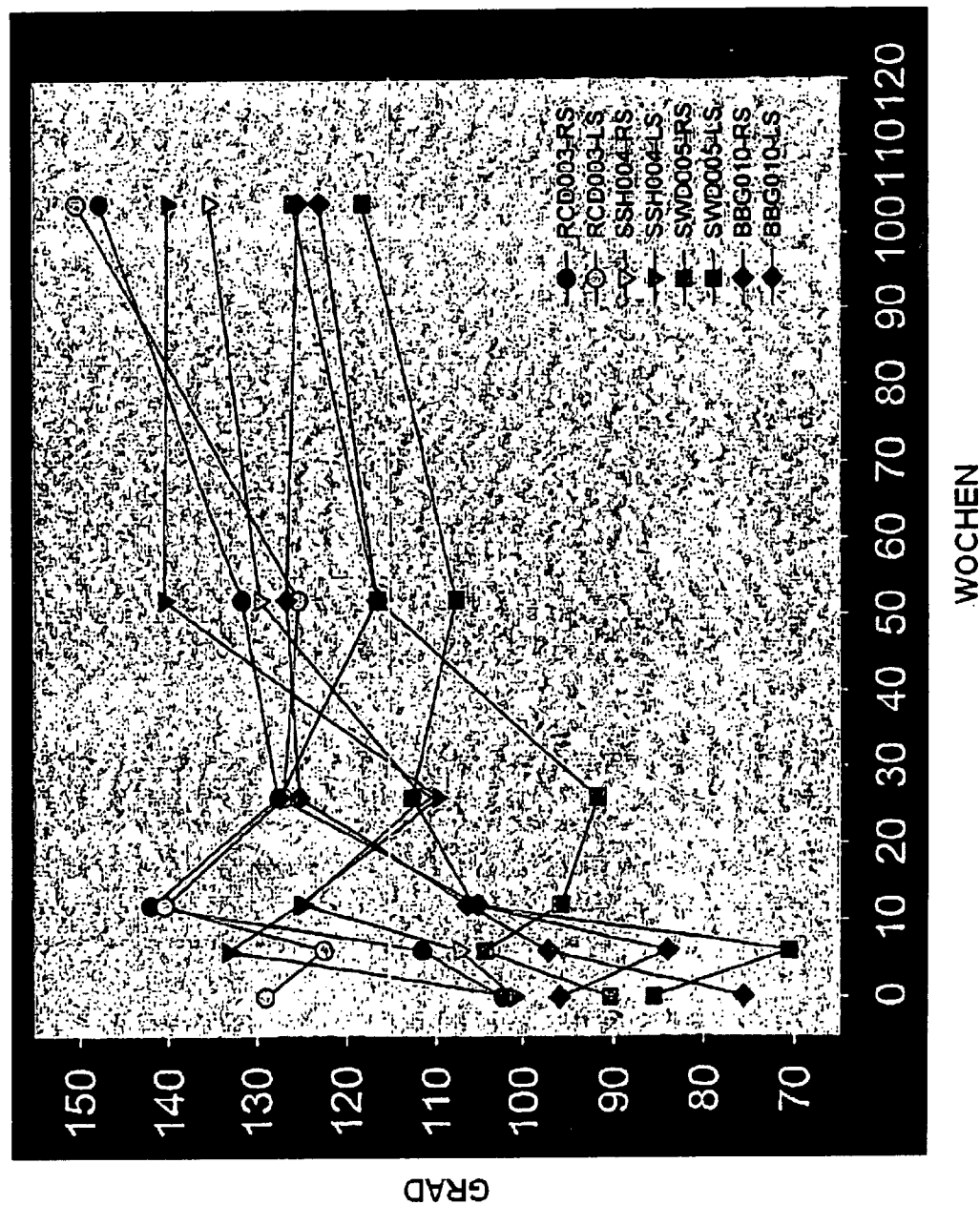
GAG-EXKRETION IM URIN BEI DER ENZYMTHERAPIE



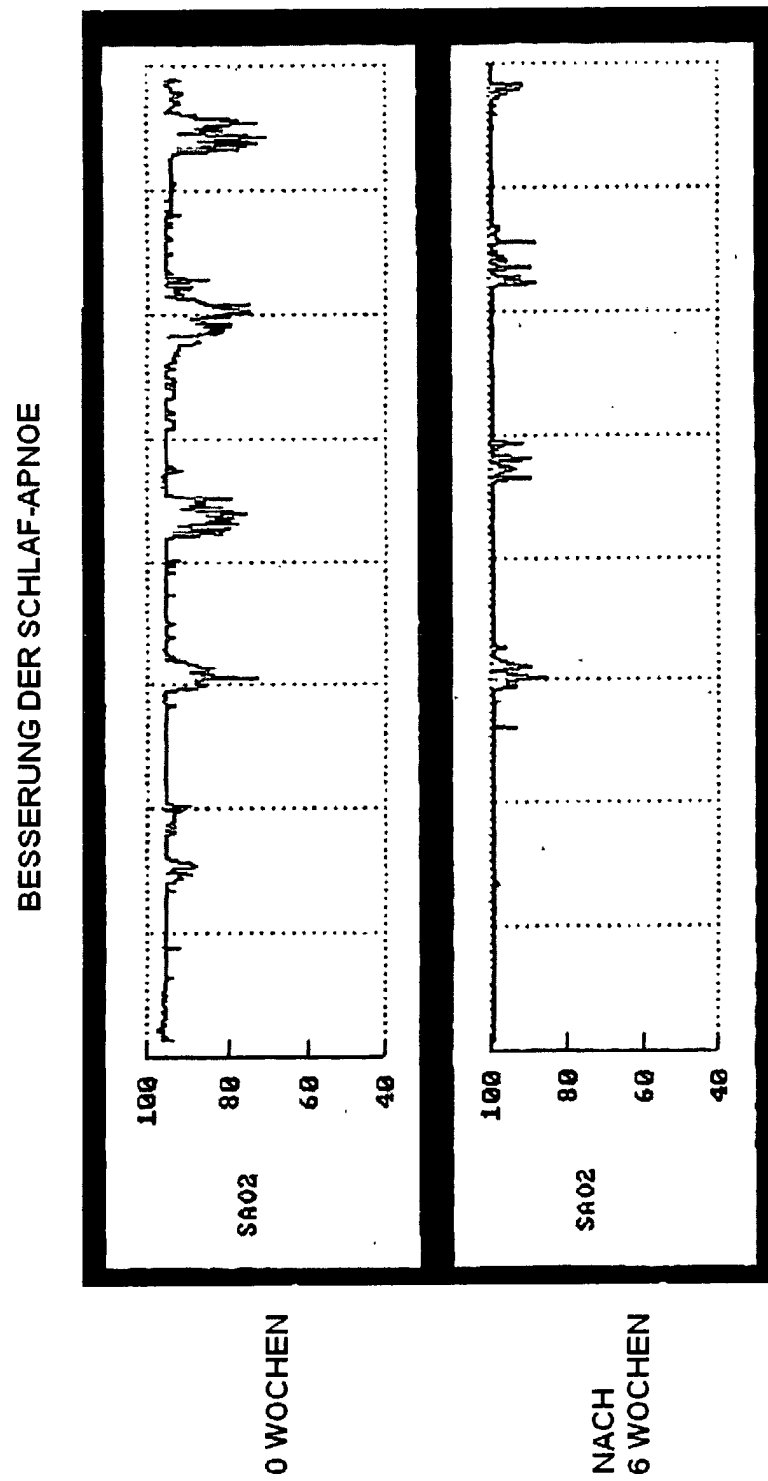
Figur 6

Figur 7

SCHULTER-BEUGUNG BIS 104 WOCHEN
BEI 4 PATIENTEN MIT DER STÄRKSTEN EINSCHRÄNKUNG

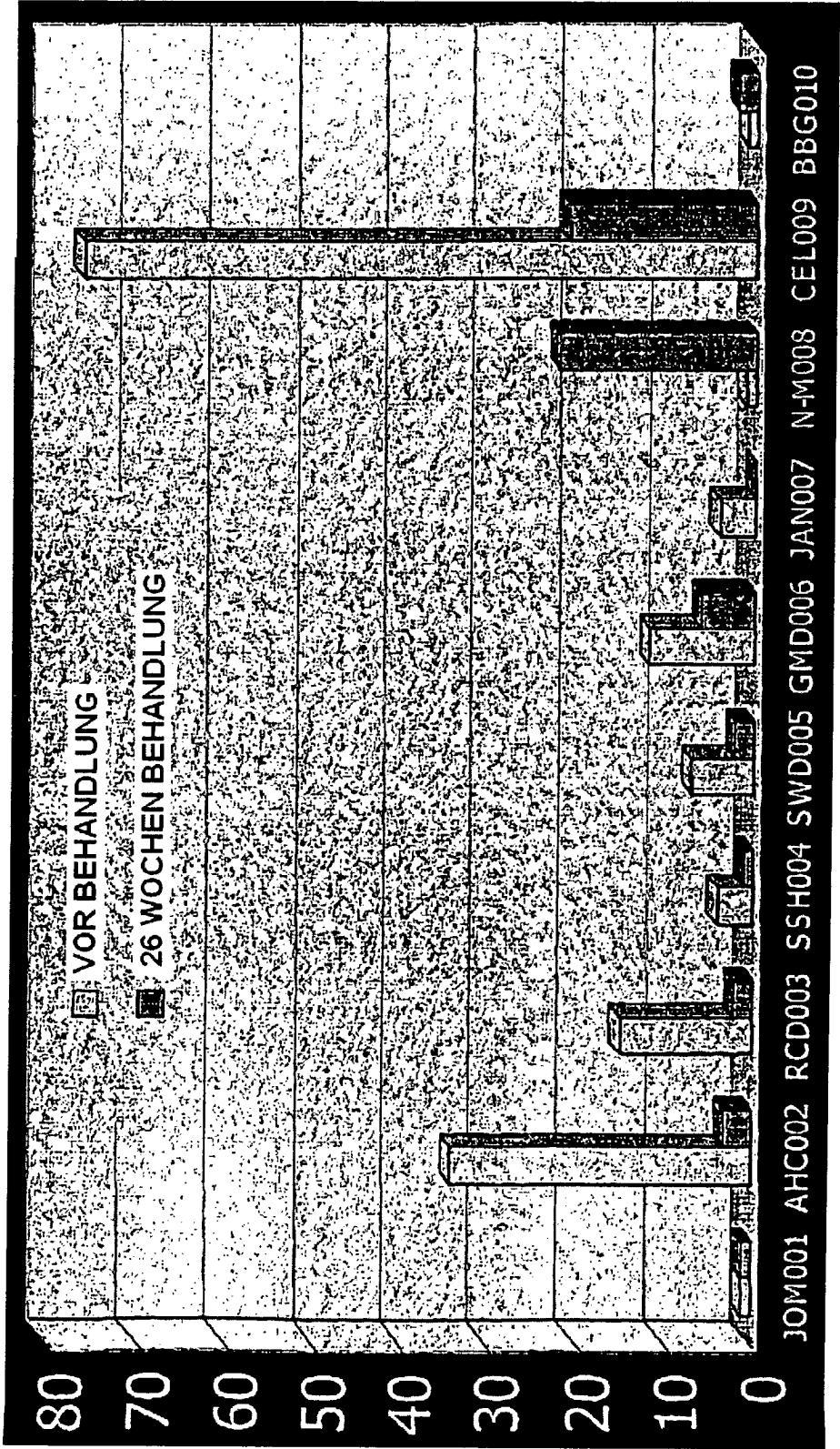


Figur 8

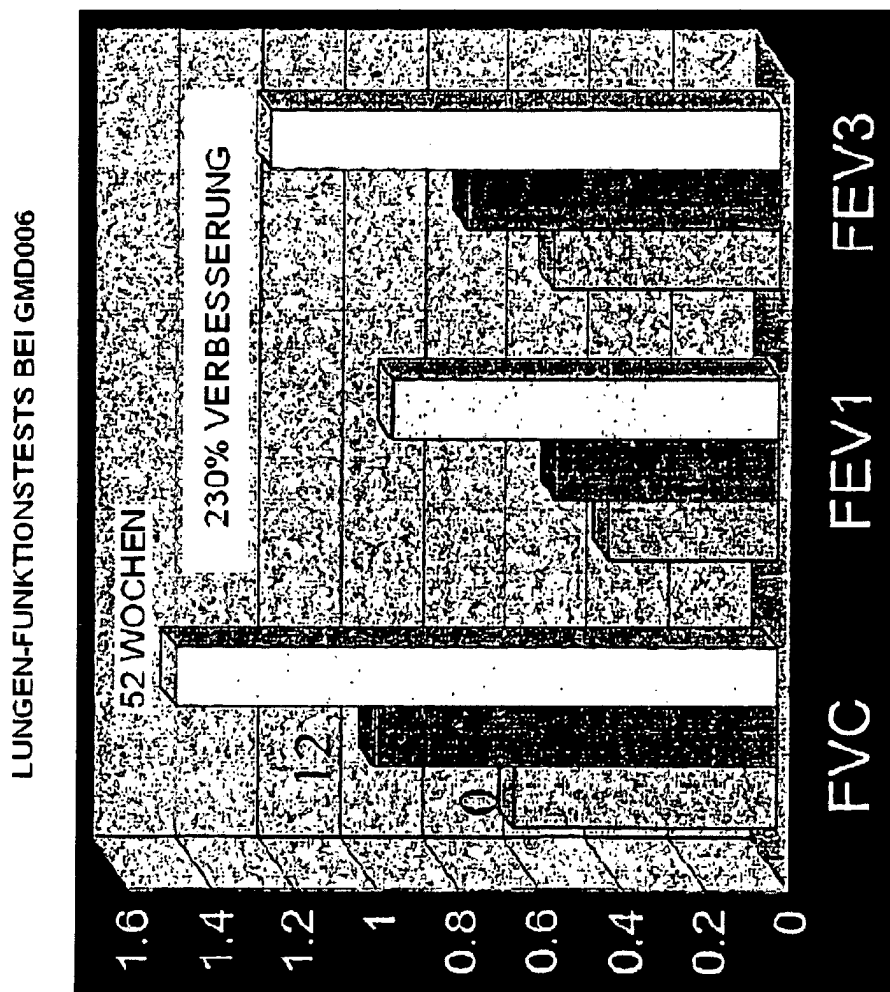


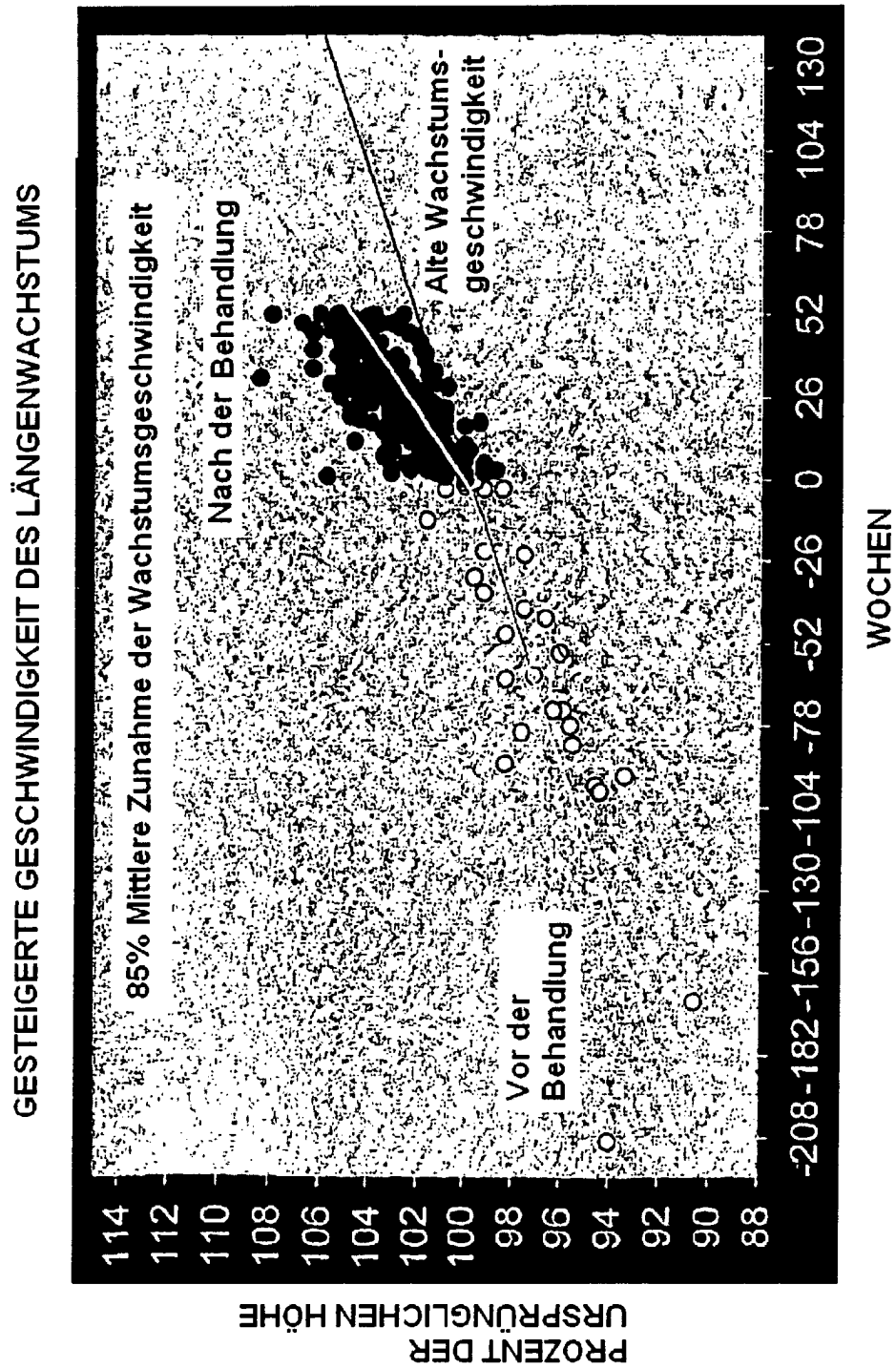
Figur 9

APNOE + HYPOPNÖE BEIM SCHLAF (vor und nach Behandlung)



Figur 10



Figur 11

Figur 12

Vergleich der Wirtsprotein-Kontaminierung zwischen einem früheren Verfahren und dem neuen Galli-Verfahren

Kontamination mit Chinesischem Hamster-Ovarial-Wirtsprotein (ELISA-Assay)

Quelle und Chargennummer	Kontamination mit CHOP-Protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Prozent CHOP-Kontamination	Reinheit des Enzyms von CHOP
Früheres Verfahren (Carson/REI)			
C9002	14	1,4%	98,6%
C9003	24	2,4%	97,6%
C9004	16	1,6%	98,4%
Neues Verfahren (Galli)			
P1003	<1,3	<0,13%	>99,9%
P1006	1,2	0,12%	99,9%
P1007	<0,6	<0,06%	>99,9%
P1008	<0,67	<0,067%	>99,9%