(12) **PATENT**

(19) NO (11) **328443** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19991225	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.09.12 PCT/US97/16603
(22)	Inng.dag	1999.03.12	(85)	Videreføringsdag	1999.03.12
(24)	Løpedag	1997.09.12	(30)	Prioritet	1996.09.13, US, 712614
(41)	Alm.tilgj	1999.05.10			
(45)	Meddelt	2010.02.22			

(73) Innehaver Shire Human Genetic Therapies, Inc, 195 Albany Street, MA02139 CAMBRIDGE, US
(72) Oppfinner Douglas A. Treco, Arlington, MA, US
Richard F. Selden, Wellesley, MA, US
Francis P. Gillespie, Lexington, MA, US
Carol M. Kinoshita, Bedford, MA, US
Melanie D. Williams, Natick, MA, US
Marianne Borowski, Winthrop, MA, US
(74) Fullmektig Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO

(54) Benevnelse **DNA-molekyl, ekspresjonskonstruksjon, dyrket human celle, kloncellestamme, kloncellelinje, protein, fremgangsmåte for fremstilling av glykosylert human alfa-galaktosidase A og human alfa-galaktosidase A samt anvendelse av en human celle som er genetisk modifisert.**

(56) Anførte publikasjoner Medin et al; Proc. Natl. Acad. Sci., vol 93, nr 15, 1996, s 7917-22, EP 0307285 A1, WO 9011353 A , Tsuji et al; Eur. J. Biochem., vol 165, nr 2, 1987, s 275-80 , WO 9412628 A , Bishop et al; Proc. Natl. Acad. Sci., vol 83, nr 13, 1986, s 4859-63, WO 9308292 A , Schoel et al; J. Chromatogr. A., vol 667, nr 1-2, 1994, s 131-9 (abstract) , Desnick et al; Proc. Natl. Acad. Sci., vol 76, nr 10, 1979, s 5326-30

(57) Sammendrag

En terapeutisk fremgangsmåte hvor et individ som man mistenker for å ha en a-galaktosidase A-mangel, så som Fabrys sykdom, behandles enten med (1) humane celler som er blitt genetisk modifisert til å over-eksprimere og utsondre humant α-gal A, eller (2) renset humant α-gal A fra dyrkede, genetisk modifiserte humane celler.

Foreliggende oppfinnelse vedrører DNA-molekyl, ekspresjonskonstruksjon, dyrket human celle, kloncellestamme, kloncellelinje, protein, fremgangsmåte for fremstilling av glykosylert human alfa-galaktosidase A og human alfa-galaktosidase A samt anvendelse av en human celle som er genetisk modifisert.

Fabrys sykdom er en X-tilknyttet arvelig lysosomlagringssykdom karakterisert ved symptomer så som alvorlig nyresvekkelse, angiokeratomer og kardiovaskulære abnormiteter, innbefattende ventrikkelforstørrelse og mitralklaff-insuffisiens. Sykdommen påvirker også det perifere nervesystem og forårsaker anfall med plagsom, brennende smerte i ekstremitetene. Fabrys sykdom forårsakes av en mangelfullhet ved enzymet α-galaktosidase A (α-gal A), som resulterer i blokkering av katabolismen av nøytrale glykosfingolipider og opphoping av enzymets substrat, keramidtriheksosid, i celler og i blodstrømmen.

På grunn av sykdommens X-tilknyttede arvemønster er hovedsakelig alle pasienter med Fabrys sykdom mannlige. Skjønt noen få alvorlig angrepne kvinnelige heterozygoter er blitt observert, er kvinnelige heterozygoter vanligvis enten asymptomatiske eller har forholdsvis svake symptomer som i stor grad er begrenset til en karakteristisk opasitet av hornhinnen. En atypisk variant av Fabrys sykdom, som oppviser lav rest- α-gal A-aktivitet og enten meget svake symptomer eller tilsynelatende ingen andre symptomer som er karakteristiske for Fabrys sykdom, samsvarer med hypertrofi av venstre ventrikkel og hjertesykdom (Nakano et al., New Engl. J. Med. 333:288-293, 1995). Det er blitt spekulert i at reduksjon i α-gal A kan være årsaken til slike hjerte-abnormiteter.

cDNA og genet som koder for humant α-gal A, er blitt isolert og sekvensert (Bishop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4859, 1986; Kornreich et al., Nuc. Acids Res. 17:3301, 1988; Oeltjen et al., Mammalian Genome 6:335-338, 1995). Humant α-gal A uttrykkes som et 429-aminosyre-polypeptid hvorav de N-terminale 31 aminosyrer utgjør et signalpeptid. Det humane enzym er blitt uttrykt i kinesisk hamster-ovarieceller (CHO) (Desnick, US-patent nr. 5 356 804; Ioannou et al., J. Cell Biol. 119:1137, 1992); insektceller (Calhoun et al., US-patent nr. 5 179 023); og COS-celler (Tsuji et al., Eur. J. Biochem. 165:275, 1987). Pilotforsøk angående α-gal A-erstatningsterapier er blitt rapportert, hvor det er blitt anvendt protein fra humant vev (Mapes et al., Science 169:987 1970; Brady et al., N. Engl. J. Med.

289:9. 1973; Desnick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5326, 1979), men det er for tiden ingen effektiv behandling når det gjelder Fabrys sykdom.

Medin et al; Proc. Natl. Accad. Sci. USA 93:7917-7922 (1996) beskriver at Fabry sykdommen er en X-koblet metabolsk forstyrrelse grunnet en mangel på α-galaktosidase A (alfa-gal A; EC 3.2.1.22). Pasienter akkumulerer glukosvingolipider med terminale alfa-galaktosyl residier som kommer fra intracellulær syntese, sirkulerende metabolitter eller fra biodegradering av senescent celler. Pasienter utvikler deretter nyre, hjerte eller cerebrovaskulær sykdom. En mulig tilnærmelse til å lindre denne forstyrrelsen er å målsøke korrigerende genoverføringsterapi til sirkulerende hematopoetiske celler. En amfotrop virusproduserende cellelinje er blitt utviklet som produserer et høyt titer (>10(6) i.p. per ml) rekombinant retrovirus konstruert å transdusere og korrigere målcellene. Virusproduserende celler demonstrerer også ekspresjon av store mengder av både intracellulær og utskilt alfa-gal A. For å undersøke anvendbarheten av denne terapeutiske vektoren ble hudfibroblaster fra Fabry pasienter korrigert for den metabolske defekten ved infeksjon med dette rekombinante virus og utskilt enzym ble observert. Videre, ble det utskilte enzymet funnet å bli tatt opp av ukorrigerte celler på en mannose-6-fosfatreseptor-avhengig måte. I beslektede eksperimenter ble udødeliggjorte B cellelinjer fra Fabry pasienter, dannet som et hematologisk leveringstestsystem transdusert. Som med fibroblastene demonstrerte transduserte pasient B cellelinjer både endogen enzymkorreksjon og liten mengde sekresjon sammen med opptak av ukorrigerte celler.

EP A1 0307285 beskriver rekombinante eukaryote celler som produserer interleukin-2 som inneholder, sammen med midler for deres ekspresjon, en DNA sekvens kodende for dihydrofolatreduktase og en DNA sekvens kodende for en hybrid forløper av interleukin-2 hvor peptidsignalet er en av de naturlige forløperene av humant veksthormon. Publikasjonen vedrører også fremgangsmåte og vektorer for oppnåelse av disse cellene og fremgangsmåte for oppnåelse av interleukin-2 fra de sistnevnte.

WO A 9011353 beskriver at Fabry sykdom er et resultat av en X-koblet mangel i enzymet alfa-galaktosidase A. Publikasjonen er rettet mot rekombinant human alfa-galaktosidase A og tilveiebringer bakulovirus ekspresjonsvektorer og rekombinante virus som tilveiebringer stabil ekspresjon av ekstracellulære og

intracellulære nivåer av dette enzymet i en insektcellekultur. Det rekombinant-avledete enzymet kan bli anvendt i en enzymerstatningsterapi for å behandle Fabry pasienter.

WO A 9412628 beskriver produksjon av human alfa-Gal A ved kloning og ekspresjon av alfa-Gal A kodende sekvens i eukaryote vertscelleekspresjonssystemer. De eukaryote ekpresjonssystemene og spesielt pattedyrvertscelleekspresjonssystemet beskrevet deri tilveiebringer kotranslasjonelle og posttranslasjonelle modifikasjoner nødvendig for prossessering, for eksempel glykosylering, fosforylering osv. og sortering av ekspresjonsprodukter slik at et aktivt enzym blir produsert. I tillegg er ekspresjonen av fusjonsproteiner som forenkler rensingen også beskrevet. Alfa-Gal A produsert i henhold til publikasjonen kan bli anvendt, men ikke begrenset til, behandling av Fabry sykdom, for hydrolyse av alfa-galaktosyl residier i glykokonjugater og/eller for omdanning av målgruppe B antigen på erotrocytter til blodgruppe O antigen.

WO A 9308292 beskriver en fremgangsmåte for transformasjon av somatiske dyreceller for å introdusere terapeutiske proteiner inn i dyret. Somatisk celletransformasjon er nyttig for medisinsk og veterinær behandling av genetiske sykdommer og andre terapeutiske eller forbedringsformål i dyr. Kopier av en eksogen genetisk konstruksjon kan bli belagt på bærerpartikler og akselerert inn i det indre av dyreceller in situ. Dersom den eksogene genetiske konstruksjonen inkluderer et sekretorisk signalpeptid er det blitt oppdaget at sirkulerende nivåer av protein kan bli oppnådd ved enkel transdermalt innskudd av bærerpartikler.

Schoel et al. J. Chromotogr. 667.131-139 (1994) beskriver studier av nyttigheten av hydrofob interaksjonskromatografi for enkel rensing av cytolytiske bakterielle toksiner. Betingelser er beskrevet for forskjellig hydrofobe interaksjonskromatografimedier for rensing av to forskjellige typer av hemolysiner, tiol-aktivert toksin listeriolycin O fra Listeria monocytogener og alfa-toksin fra Staphylococcus aureus. Resultatene foreslår muligheten av anvendelse av hydrofob interaksjonskromatografi, spesielt med kolonner med svak hydrofobisitet, for rensing av bakterielle hemolyciner i et høyt utbytte.

Det er blitt funnet at uttrykking av et DNA som koder for humant α-gal A i dyrkede humane celler, gir et polypeptid som er passende glykosylert, slik at det ikke bare er enzymatisk aktivt og kan virke på glykosfingolipid-substratet som

opphopes ved Fabrys sykdom, men også effektivt internaliseres av celler via celle-overflatereseptorer som bringer det nøyaktig dit hvor det trenges ved denne sykdom; lysosom-delen av angrepne celler, spesielt endotelcellene som bekler pasientens blodkar innvendig. Denne oppdagelse, som er omtalt mer detaljert nedenfor, betyr at et individ som man mistenker har en α-gal A-mangelfullhet så som Fabrys sykdom, kan behandles enten med (1) humane celler som er blitt genetisk modifisert til å over-eksprimere og utsondre humant α-gal A, eller (2) renset humant α-gal A fra dyrkede, genetisk modifiserte humane celler.

Terapi ved hjelp av den første måte, dvs. med selve de modifiserte celler, innbefatter gen-manipulering av humane celler (f.eks. primærceller, sekundær-celler eller immortaliserte celler) in vitro eller ex vivo for å bevirke at de uttrykker og utsondrer høye nivåer av humant α-gal A, fulgt av implantering av cellene i pasienten, som beskrevet generelt i Selden et al., WO 93/09222.

Når celler skal modifiseres genetisk for de formål å behandle Fabrys sykdom enten ved hjelp av genterapi eller enzymerstatningsterapi, kan et DNA-molekyl som inneholder en α-gal A-cDNA- eller genom-DNA-sekvens, inngå i en ekspresjonskonstruksjon og innføres i primære eller sekundære humane celler (f.eks. fibroblaster, epitelceller innbefattende bryst- og intestinal-epitelceller, endtelceller, formede elementer i blodet innbefattende lymfocytter og benmargs-celler, gliaceller, hepatocytter, keratinocytter, muskelceller og nerveceller, eller forløperne til disse celletyper) ved hjelp av standardmetoder for transfektering, innbefattende, men ikke begrenset til, liposom-, polybren- eller DEAE dekstran-formidlet transfektering, elektroporering, kalsiumfosfatutfelning, mikroinjeksjon eller hastighetsdrevne mikroprosjektiler («biolistiner»). Man kan alternativt anvende et system som avgir DNA ved hjelp av virusvektor. Virus som er kjent for å være egnet til genoverføring, innbefatter adenovirus, adenotilknyttet virus, herpesvirus, kusmavirus, poliovirus, retrovirus, Sindbis-virus og koppevirus så som kanarikoppevirus («canary pox virus»). Skjønt primære eller sekundære celle-kulturer er foretrukket, kan man også anvende udødeliggjorte humane celler. Eksempler på udødeliggjorte humane cellelinjer egnet ved foreliggende metoder innbefatter, men er ikke
begrenset til, Bowes melanomceller (ATCC adkomstnr. CRL 9607), Daudi-celler (ATCC adkomstnr. CCL 213), HeLa-celler og derivater av HeLa-celler (ATCC

adkomstnr. CCL 2, CCL 2.1 og CCL 2.2), HL-60-celler (ATCC adkomstnr. CCL 240), HT1080-celler (ATCC adkomstnr. CCL 121), Jurkat-celler (ATCC adkomst nr. TIB 152), KB karsinomceller (ATCC adkomstnr. CCL 17), K-562 leukemiceller (ATCC adkomstnr. CCL 243), MCF-7 brystkreftceller (ATCC adkomstnr. BTH 22), MOLT-4-celler (ATCC adkomstnr. 1582), Namalwa-celler (ATCC adkomstnr. CRL 1432), Rajiceller (ATCC adkomstnr. CCL 86), RPMI 8226-celler (ATCC adkomst nr. CCL 155), U-937-celler (ATCC adkomstnr. CRL 1593), WI-38VA13-celler sublinje 2R4 (ATCC adkomstnr. CLL 75.1) og 2780AD ovariekarsinomceller (Van der Blick et al., Cancer Res. 48:5927-5932, 1988) samt heterohybridomceller dannet ved fusjon av humane celler og celler fra en annen art. Sekundære humane fibro-blaststammer, så som WI-38 (ATCC adkomstnr. CCL 75) og MRC-5 (ATCC adkomst nr. CCL 171), kan også anvendes.

Etter genetisk oppbygging av humane celler med et DNA-molekyl som koder for α-gal A (eller etter en annen passende genetisk modifikasjon, som beskrevet nedenfor), under dannelse av en celle som over-eksprimerer og utsondrer α-gal A, kan det dannes en klon-cellestamme som i det vesentlige består av mange genetisk identiske dyrkede primære humane celler, eller hvor cellene er udødeliggjorte, en kloncellelinje som i det vesentlige består av mange genetisk identiske udødeliggjorte humane celler. Cellene i kloncellestammen eller kloncellelinjen er fortrinnsvis fibroblaster.

De genetisk modifiserte celler kan så prepareres og innføres i pasienten ved hjelp av hensiktsmessige metoder, f.eks. som beskrevet i Selden et al., WO 93/09222.

Genterapi har en rekke fordeler fremfor enzym-erstatningsterapi når det gjelder enzym fra humant eller animalsk vev. Den avhenger ikke av den eventuelt ikke-konsekvente tilgjengelighet av kilder til passende vev, og er således en kommersielt levedyktig metode til behandling av α-gal A-mangel. Den er forholdsvis risikofri sammenliknet med enzymerstatningsterapi med enzym fra humant vev, som kan være infisert med kjente eller ukjente virus og andre infiserende midler. Videre har genterapi en rekke fordeler fremfor enzymerstatningsterapi generelt.

Som beskrevet ovenfor, kan individer med α-gal A-mangelfullhet også behandles med renset α-gal A (dvs. enzymerstatningsterapi). Primære, sekun-

dære eller immortaliserte humane celler som er genetisk modifisert til å over-eksprimere humant α-gal A, vil også være nyttige for proteinfremstilling in vitro, ved fremstilling av protein som kan renses for enzymerstatningsterapi. Sekundære eller immortaliserte humane celler kan velges blant dem som er beskrevet ovenfor, og kan modifiseres genetisk ved transfeksjons- eller transduksjons-metodene som også er beskrevet ovenfor. Etter genetisk modifikasjon dyrkes cellene under betingelser som muliggjør over-ekspresjon og utsondring av α-gal A. Proteinet isoleres fra de dyrkede celler ved oppsamling av mediet hvor cellene er dyrket og/eller lysering av cellene for frigjøring av innholdet i dem, og deretter anvendelse av standard-proteinrensingsteknikker. Én slik teknikk innbefatter at dyrkningsmediet, eller hvilken som helst prøve som inneholder humant α-gal A, ledes over en hydrofob vekselvirkningsharpiks så som Butyl Sepharose® eller en annen harpiks med en funksjonell del som innbefatter en butylgruppe. Leding av prøven over en slik harpiks kan utgjøre det første kromatografitrinn. Hvis ytterligere rensing trenges, kan det α-gal A-holdige materiale som er eluert fra den hydrofobe vekselvirkningsharpiks, ledes over en kolonne inneholdende en andre harpiks, så som en immobilisert heparinharpiks så som Heparin Sepharose®, hydroksyapatitt, en anionbytterharpiks så som Q Sepharose® eller en størrelses-utelukkelsesharpiks så som Superdex® 200. Renseprotokollen vil fortrinnsvis innbefatte anvendelse av hver av ovennevnte typer harpikser. Alternativt kan man anvende én eller flere av sistnevnte harpikser før eller i stedet for den hydrofobe vekselvirkningsharpiks.

Tidligere metoder for fremstilling av α-gal A med forholdsvis høy renhet var avhengig av anvendelse av affinitetskromatografi, med anvendelse av en kombinasjon av lektinaffinitetskromatografi (concanavalin A (Con A) Sepharose) og affinitetskromatografi basert på binding av α-gal A til substrat-analogen N-6-aminoheksanoyl-α-D-galaktosylamin koplet til en Sepharose-matriks (Bishop et al., J. Biol. Chem. 256:1307-1316, 1981). Anvendelse av proteinholdige lektin-affinitetsharpikser og substrat-analoge harpikser er typisk forbundet med kontinuerlig utluting av affinitetsmidlet fra den faste bærer (jf. Marikar et al., Anal. Biochem. 201:306-310, 1992), noe som resulterer i forurensing av det rensede produkt med affinitetsmidlet enten fritt i løsning eller bundet til eluert protein. Slike forurensninger gjør produktet uegnet for anvendelse i farmasøytiske preparater.

Bundne substrat-analoger og lektiner kan også ha hovedsakelig negative virkninger på de enzymatiske, funksjonelle og strukturelle egenskaper hos proteiner. Videre er slike affinitetsharpikser typisk kostbare å fremstille, noe som gjør anvendelsen av slike harpikser mindre egnet for produksjon i kommersiell målestokk enn mer konvensjonelle kromatografiharpikser.

Foreliggende oppfinnelse vedrører DNA-molekyl, kjennetegnet ved at det omfatter en første sekvens som koder for human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR: 21; og, knyttet til 3' end av den første sekvensen, en andre sekvens kodende for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A.

DNA-molekylet omfatter et intron i sekvensen som koder for signalpeptidet.

DNA-molekylet ifølge oppfinnelsen omfatter videre en utranslatert sekvens på minst 6 nukleotider beliggende rett 3' for termineringskodonet til den andre sekvensen, idet nevnte utranslaterte sekvens omfatter et polyadenyleringssete.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en ekspresjonskonstruksjon, kjennetegnet ved at den omfatter DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og er egnet for ekspresjon i en human celle.

Det er videre beskrevet dyrket human celle, kjennetegnet ved at den omfatter

(i) ekspresjonskonstruksjoner ifølge krav 6, eller

(ii) DNA-molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR:21 og (b) muliggjør ekspresjon av polypeptidet i cellen.

Oppfinnelsen vedrører videre dyrket human celle eller en kloncellelinje eller stamme som definert i et hvilket som helst av kravene 7 til 9 eller 11 til 14, kjennetegnet ved at den er for anvendelse i terapi.

Det er også beskrevet kloncellstamme, kjennetegnet ved at den

(i) består hovedsakelig av mange dyrkede humane celler transfektert med et DNA-molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptide omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid (SEKV ID NR: 21), og (b) muliggjør overekspresjon av polypeptidet i cellene; eller

(ii) av de dyrkede cellene som definert i hvilke som helst av kravene 7 til 9.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre kloncellelinje, kjennetegnet ved at den den

(i) består hovedsaklig av mange udødliggjorte humane celler transfektert med DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid (SEKV ID NR: 21) og (b) muliggjør overekspresjon av polypeptidet i cellene; eller

(ii) av de dyrkede cellene som definert i hvilke som helst av kravene 7 til 9.

Det er videre beskrevet protein, kjennetegnet ved at det blir kodet av DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5.

Et individ som man mistenker har en α-gal A-mangel, kan behandles ved administrering av farmasøytisk akseptabelt, renset humant α-gal A ved hjelp av hvilken som helst standardmetode, innbefattende, men ikke begrenset til, intravenøs, subkutan eller intramuskulær injeksjon, eller som faststoff-implantat. Det rensede protein kan utformes i et terapeutisk preparat bestående av en vandig løsning inneholdende en fysiologisk akseptable eksipiens, f.eks. en bærer så som humant serumalbumin, ved pH 6,5 eller lavere.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte for fremstilling av glykosylert human alfa-galaktosidase A, kjennetegnet ved at det omfatter

(i) dyrking av cellen ifølge krav 8 under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra DNA-molekylet og sekresjon av glykosylert human alfa-galaktosidase A i dyrkningsmediet til cellen; og
isolering av glykosylert human alfa-galaktosidase A fra dyrkningsmediet;

(ii) dyrking av cellen ifølge krav 10 under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra nevnte DNA-molekyl og sekresjon av glykosylert human alfa-galaktosidase A inn i kulturmediet til cellen; og

isolering av glykosylert human alfa-galaktosidase A fra dyrkningsmediet; eller

(iii) dyrking av en human celle inneholdende DNA-molekyl ifølge krav 1 som koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra nevnte DNA-molekyl.

Det er videre beskrevet fremgangsmåte for fremstilling av human alfa-galaktosidase A, kjennetegnet ved at den omfatter

(a) tilveiebringing av en transfekt human celle genetisk modifisert å omfatte DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og å uttrykke human alfa-galaktosidase A, og

(b) oppnå human alfa-galaktosidase A fra nevnte celler.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer således en måte til oppnåelse av store mengder av hensiktsmessig glykosylert og derfor terapeutisk egnet humant α-gal A. Dette gjør enzymerstatningsterapi ved α-gal-mangel kommersielt levedyktig, samt relativt risikofritt sammenliknet med terapi med enzym fra humant eller animalsk vev.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en human celle genetisk modifisert *ex vivo* til å omfatte DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og å overuttrykke og utskille human alfa-galaktosidase A for fremstilling av et medikament for behandling av en pasient antatt å ha en a-galaktosidase A mangel vesentlig som beskrevet i beskrivelsen.

Fagfolk på området vil være klar over at den humane α-gal A-DNA-sekvens (enten cDNA eller genom-DNA) eller sekvenser som er forskjellige fra denne enten på grunn av stumme kodonforandringer eller kodonforandringer som gir konservative aminosyresubstitusjoner, kan anvendes til genetisk modifisering av dyrkede humane celler slik at de vil over-eksprimere og utsondre enzymet. Det er også mulig at visse mutasjoner i α-gal A-DNA-sekvensen vil kode for polypeptider som bibeholder eller oppviser forbedret α-gal A-enzymatisk aktivitet (noe som vil være åpenbart ved ekspresjon av det mutante DNA-molekyl i dyrkede celler, rensing av det kodede polypeptid og måling av den katalytiske aktivitet, som beskrevet i det foreliggende). Man vil for eksempel vente at konservative aminosyresubstitusjoner har liten eller ingen virkning på den biologiske aktivitet, spesielt

hvis de representerer mindre enn 10% av det totale antall rester i proteinet. Konservative substitusjoner innbefatter typisk substitusjoner i følgende grupper: glycin, alanin; valin, isoleucin, leucin; asparaginsyre, glutaminsyre; asparagin, glutamin; serin, treonin; lysin, arginin; og fenylalanin, tyrosin.

Cellenes dannelse av α-gal A kan maksimeres ved hjelp av visse genetiske manipulasjoner. For eksempel kan DNA-molekylet som koder for α-gal A, også kode for et heterologt signalpeptid, så som signalpeptidet for humant veksthormon (hGH), erytropoietin, Faktor VIII, Faktor IX, glukagon, lavdensitets-lipoprotein-(LDL)-reseptoren eller et annet lysosomalt enzym enn α-gal A. Signalpeptidet er fortrinnsvis hGH-signalpeptidet (SEKV ID NR. 21) og er i den N-terminale ende av det kodede protein. DNA-sekvensen som koder for signalpeptidet, kan inneholde et intron så som det første intron i hGH-genet, som resulterer i en DNA-sekvens så som SEKV ID NR. 27 (se også fig. 10). Videre kan DNA-molekylet også inneholde en 3' ikke-translatert sekvens (UTS) som har en lengde på minst 6 nukleotider (i motsetning til α-gal A-mRNA som finnes hos mennesker, og som ikke har noen 3' UTS, idet det nødvendige polyadenyleringssete er inne i kodings-sekvensen). UTS befinner seg umiddelbart 3' i forhold til terminerings-kodonet i kodesekvensen og innbefatter et polyadenyleringssete. Den har fortrinnsvis en lengde på minst 6 nukleotider, mer foretrukket minst 12, og mest foretrukket minst 30, og i alle tilfeller inneholder den sekvensen AATAAA eller en beslektet sekvens som tjener til befordring av polyadenylering.

Andre trekk og fordeler ved oppfinnelsen vil bli åpenbare ut fra den detaljerte beskrivelse som følger, samt kravene.

Betegnelsen «genetisk modifisert» anvendt i det foreliggende ved henvisning til celler, er ment å innbefatte celler som uttrykker et spesielt genprodukt etter innføring av et DNA-molekyl som koder for genproduktet, og/eller regulerende elementer som regulerer ekspresjonen av en kodingssekvens. Innføring av DNA-molekylet kan utføres ved gen-målsøking (dvs. innføring av et DNA-molekyl i et spesielt genom-sete); videre muliggjør homolog rekombinasjon erstatning av selve det defekte gen (det defekte α-gal A-gen eller en del av det kan erstattes i en Fabry-pasients egne celler med hele genet eller en del derav).

Betegnelsen «α-gal A» anvendt i det foreliggende betyr α-gal A uten signalpeptid, dvs. SEKV ID NR. 26 (fig. 9). Det er en viss indikasjon på at restene

371-398 eller 373-398 i SEKV ID NR. 26 (fig. 9) kan fjernes i lysosomet; imidlertid antas det at fjerning av dette antatte propeptid ikke påvirker enzymets aktivitet. Dette tyder på at hvilken som helst del av det antatte propeptid kan utelates uten at det påvirker aktiviteten. Således dekker betegnelsen «α-gal A» som anvendt i det foreliggende, også et protein med en sekvens som svarer til SEKV ID NR. 26, bortsett fra at det mangler opp til 28 rester i den C-terminale ende av denne sekvens.

Med «α-gal A-mangel» menes hvilken som helst mangel i mengden eller aktiviteten av dette enzym hos en pasient. Mangelen kan bevirke alvorlige symptomer som typisk observeres hos mannlige pasienter som lider av Fabrys sykdom, eller den kan være bare partiell og gi forholdsvis svake symptomer, slik som det kan sees hos heterozygote kvinnelige bærere av det defekte gen.

Anvendt i det foreliggende innbefatter betegnelsen «primærcelle» celler som finnes i en suspensjon av celler isolert fra en virveldyr-vevskilde (før utplating av dem, dvs. festing til et vevskulturunderlag så som en skål eller kolbe), celler som finnes i et eksplantat fra vev, begge de foregående typer celler utplatet første gang, samt cellesuspensjoner tilveiebrakt fra disse utplatede celler.

«Sekundære celler» angir celler i alle etterfølgende trinn ved dyrkningen. Det vil si at første gang en utplatet primærcelle fjernes fra dyrkningsunderlaget og gjen-utplates (gjennomgår en runde), omtales den som en sekundær celle, og likeså alle celler i etterfølgende runder.

En «cellestamme» består av sekundære celler som har gjennomgått én eller flere runder; oppviser et endelig antall middelpopulasjons-doblinger i kultur; oppviser egenskapene ved en kontakt-inhibert, forankringsavhengig vekst (bortsett fra celler som er formert i suspensjonskultur); og er ikke immortalisert.

Med «immortalisert celle» menes en celle fra en etablert cellelinje som oppviser et tilsynelatende ubegrenset livsforløp i kultur.

Med «signalpeptid» menes en peptidsekvens som styrer et nylig syntetisert polypeptid som det er festet til, til det endoplasmatiske retikulum for ytterligere post-translasjonell bearbeidelse og/eller fordeling.

Betegnelsen «heterologt signalpeptid» anvendt i det foreliggende i forbindelse med α-gal A angir et signalpeptid som ikke er det humane α-gal A-signal-

peptid (dvs. det som er kodet for av nukleotidene 36-128 i SEKV ID NR. 18). Det er typisk signalpeptidet i et eller annet pattedyrprotein som ikke er α-gal A.

Betegnelsen «første kromatografitrinn» angir den første påføring av en prøve på en kromatografikolonne (alle trinn knyttet til fremstillingen av prøven er utelukket).

Det vises nå til tegningene.

Fig. 1 er en presentasjon av proben på 210 bp som ble anvendt til isolering av α-gal A fra et humant fibroblast-cDNA-bibliotek (SEKV ID NR. 19). Sekvensen er fra ekson 7 i α-gal A-genet. Proben ble isolert fra human genom-DNA ved hjelp av polymerasekjedereaksjonen (PCR). Områdene som er understreket på figuren, svarer til sekvensene i amplifikasjons-primerne.

Fig. 2 er en representasjon av sekvensen av DNA-fragmentet som fullfører 5'-enden av α-gal A-cDNA-klonet (SEKV ID NR. 20). Dette fragment ble amplifisert fra human genom-DNA ved hjelp av PCR. De understrekede områder svarer til sekvensene for amplifikasjons-primerne. Posisjonene for NcoI- og SacII-restrik-sjonsendonukleasesetene, som ble anvendt til subkloning som beskrevet i eksem-pel IA, er også vist.

Fig. 3 er en representasjon av sekvensen av α-gal A-cDNA, innbefattende sekvensen som koder for signalpeptidet (SEKV ID NR. 18).

Fig. 4 er et skjematisk kart over pXAG-16, en α-gal A-ekspresjons-konstruksjon som innbefatter CMV-(cytomegalovirus)-promoteren og -intronet, den hGH-signalpeptid-kodende sekvens og første intron, cDNA for α-gal A (dvs. som mangler α-gal A-signalpeptidsekvensen) og hGH 3' UTS.

Fig. 5 er et skjematisk kart over pXAG-29, en α-gal A-ekspresjonskonstruk-sjon som innbefatter kollagen-Iα2-promoteren, et β-aktin-intron, den hGH-signal-peptid-kodende sekvens og første intron, cDNA for α-gal A (dvs. som mangler α-gal A-signalpeptidsekvensen) og hGH 3' UTS.

Fig. 6 er et kromatogram over α-gal A-rensetrinnet med anvendelse av Butyl Sepharose®-harpiks. Absorbansen ved 280 nm (ren linje) og α-gal A-aktivitet (prikket linje) for utvalgte fraksjoner er vist.

Fig. 7 er et linjediagram som viser internalisering i Fabry-fibroblaster av humant α-gal A fremstilt i henhold til oppfinnelsen. Den intracellulære α-gal A-aktivitet og totalprotein-konsentrasjon ble målt etter inkubering av cellene med

økende konsentrasjoner av humant α-gal A fremstilt i henhold til oppfinnelsen. Effektene av de potensielle internaliserings-inhibitorer mannose-6-fosfat (M6P; åpne romber) og mannan (åpne sirkler) er vist.

Fig. 8 er et skjematisk diagram over forsøks-mønsteret utformet for undersøkelse av Fabry-fibroblaster etter internalisering av α-gal A. α-gal A-aktiviteten hos Fabry-cellene måles etter eksponering for enten normale eller α-gal A-overeksprimerende humane fibroblaster dyrket i Transwell®-innskudd. «M6P» = mannose-6-fosfat; «Untrf HF» = ikke-transfekterte humane fibroblaster; «BRS11» = en transfektert, α-gal A-overeksprimerende fibroblaststamme.

Fig. 9 er en presentasjon av den humane α-gal A-aminosyresekvens (SEKV ID NR. 26).

Fig. 10 er en presentasjon av DNA-sekvensen som koder for hGH-signalpeptidet og som inneholder det første hGH-intron (understreket) (SEKV ID NR. 27).

Fig. 11 er en presentasjon av DNA-sekvensen som koder for hGH-signalpeptidet uten intronet (SEKV ID NR. 22).

Fig. 12 er en presentasjon av aminosyresekvensen hos hGH-signalpeptidet (SEKV ID NR. 21).

Fig. 13 er en presentasjon av cDNA-sekvensen som koder for humant α-gal A (uten signalpeptid) (SEKV ID NR. 25).

Lysosomal-enzymer så som α-gal A siktes inn mot lysosom-delen av en celle ved vekselvirkning med mannose-6-fosfat-(M6P)-reseptoren, som bindes til M6P-rester som finnes i oligosakkarid-delene av enzymer med kurs mot lysosom-delen (S. Kornfeld og I. Mellman, Ann. Rev. Cell Biol. 5:483-525, 1989). Den primære vekselvirkning skjer i Golgi, hvor enzymer bundet til Golgi M6P-reseptorer utskilles for transport til lysosomene. En sekundær type vekselvirkning antas å finne sted mellom ekstracellulært α-gal A og M6P-reseptorer på celleoverflaten. Ekstracellulære substanser internalisert av celler transporteres gjennom cytoplasma i endocytiske vesikler, som smelter sammen med primære lysosomer og tømmer sitt innhold i lysosomene. Ved denne prosess innlemmes også celleoverflate-M6P-reseptorer i endocytiske vesikler og transporteres til lysosomer.

Et hvert α-gal A som finnes i det ekstracellulære miljø kan, hvis det bærer M6P-rester, bindes til celleoverflate-M6P-reseptorene og derved transporteres inn

i lysosom-delen sammen med reseptorene. Straks enzymet er i lysosom-delen som resultat av denne fjerningsvei, kan det utføre sin hensiktsmessige funksjon. Således finnes det en mekanisme for at en celle skal kunne ta opp eksogent dannet enzym selv om den genetisk har utilstrekkelig dannelse av sitt eget α-gal A, under forutsetning av (a) at enzymet er passende glykosylert og (b) den mangelfulle celle bærer M6P-reseptorer.

Ved Fabrys sykdom er det vist at vaskulære endotelceller i nyre og hjerte oppviser alvorlige histopatologiske abnormiteter og bidrar til den kliniske patologi ved sykdommen; disse celler, som bærer M6P-reseptorer, er et spesielt mål for den her patentsøkte oppfinnelse. α-gal A dannet i henhold til oppfinnelsen kan avgis enten lokalt eller systemisk til de angrepne celler, ved genterapi (dvs. ved genetisk modifiserte celler som eksprimerer og utsondrer det glykosylerte enzym i pasienten), eller ved vanlige farmakologiske administreringsmåter. Et α-gal A hvor M6P er tilstede i de N-bundne oligosakkarider er derfor av stor betydning for terapi.

Videre er graden ved hvilken de N-bundne oligosakkarider i α-gal A modifiseres ved sialylering også av stor betydning. Ved fravær av passende sialylering vil α-gal A hurtig bli klaret fra sirkulasjonen på grunn av binding ved hepatiske asialoglykoprotein-reseptorer, fulgt av internalisering og nedbryting av hepatocytter (Ashwell og Harford, Ann. Rev. Biochem. 51:531-554, 1982). Dette reduserer mengden av α-gal A som er tilgjengelig i sirkulasjonen for binding til M6P-reseptorer på celler som bidrar til den kliniske patologi ved Fabrys sykdom, så som de vaskulære endotelceller i nyre og hjerte. Søkerne har overraskende funnet at α-gal A som utsondres av stabilt transfekterte humane celler, har glykosyleringsegenskaper som er egnet for behandling av Fabrys sykdom enten med genterapi eller ved hjelp av vanlig farmasøytisk administrering av det rensede utsondrede protein. Dette er i motsetning til situasjonen med det best undersøkte lysosomal-enzym, glukocerebrosidase, hvor avgivelse av enzymet renset fra human placenta eller utsondret fra transfekterte CHO-celler til de klinisk relevante celler i kroppen fordrer kompleks enzymatisk modifisering av enzymet etter rensing (cf. Beutler, New Engl. J. Med. 325:1354-1360, 1991).

Terapi kan utføres på én av to generelle måter: ved at det i pasienten innføres en terapeutisk effektiv mengde renset humant α-gal A fra dyrkede

humane celler som er genetisk modifisert for overeksprimering og utsondring av enzymet, eller ved at selve den overeksprimerende celle innføres i pasienten. Teknikker for utførelse av de nødvendige genetiske modifikasjoner er omtalt nedenfor, og likeså metodene for rensing, utforming og behandling.

Eksempel I. Fremstilling og anvendelse av konstruksjoner utformet for avgivelse og ekspresjon av α-gal A

To ekspresjonsplasmider, pXAG-16 og pXAG-28, ble konstruert. Disse plasmider inneholder human α-gal A-cDNA som koder for de 398 aminosyrer i α-gal A-enzymet (uten α-gal A-signalpeptidet); den humane veksthormon-(hGH)-signalpeptid-genom-DNA-sekvens, som er avbrutt av det første intron i hGH-genet; og den ikke-translaterte 3'-sekvens (UTS) i hGH-genet, som inneholder et signal for polyadenylering. Plasmid pXAG-16 har den umiddelbart tidlige humane cytomegalovirus-(CMV IE)-promoter og første intron (flankert av ikke-kodende ekson-sekvenser), mens pXAG-28 drives av kollagen-Iα2-promoteren og også inneholder β-aktin-genets 5' UTS, som inneholder det første intron i β-aktin-genet.

A. Kloning av den komplette α-gal A-cDNA og konstruksjon av α-gal A-ekspresjonsplasmidet pXAG-16

Den humane α-gal cDNA ble klonet fra et human-fibroblast-cDNA-bibliotek som ble konstruert som følger. Poly-A^+-mRNA ble isolert fra total-RNA, og cDNA-syntese ble utført under anvendelse av reagenser for lambda-ZapII®-systemet i henhold til fabrikantens instruksjoner (Stratagene Inc., LaJolla, CA). Kort angitt ble «førstekjede»-cDNA dannet ved reversert transkripsjon i nærvær av en oligo-dT-primer inneholdende et internt XhoI-restriksjonsendonuklease-sete. Etter behandling med RNase H, ble cDNA «nick»-translatert med DNA-polymerase I under dannelse av dobbeltkjedet cDNA. Denne cDNA ble gjort stump-endet med T4-DNA-polymerase, og ligert til EcoRI-adaptorer. Produktene fra denne ligering ble behandlet med T4-DNA-kinase og digerert med XhoI. cDNA ble fraksjonert ved hjelp av Sephacryl-400®-kromatografi. Fraksjoner med stor og middels størrelse ble blandet og cDNA'ene ligert til EcoRI- og XhoI-digererte Lambda ZapII-armer. Produktene fra denne ligering ble deretter pakket og titrert. Det primære bibliotek hadde en titer på $1,2 \times 10^7$ pfu/ml og en gjennomsnittlig innskuddsstørrelse på

925 bp.

En 210 bp probe fra ekson 7 i det humane α-gal A-gen (fig. 1, SEKV ID NR. 19) ble anvendt til isolering av cDNA. Selve proben ble isolert fra genom-DNA ved polymerasekjedereaksjonen (PCR) under anvendelse av følgende oligonukleotider: 5'-CTGGGCTGTAGCTATGATAAAC-3' (Oligo 1; SEKV ID NR. 1) og 5'-TCTAGCTGAAGCAAAACAGTG-3' (Oligo 2; SEKV ID NR. 2). PCR-produktet ble deretter anvendt til screening av fibroblast-cDNA-biblioteket, og positive kloner ble isolert og ytterligere karakterisert. Én positiv klon, fag 3A, ble underkastet den lambda-ZapII®-system-utskjærende protokoll (Stratagene, Inc., La Jolla, CA), i henhold til fabrikantens instruksjoner. Denne metode ga plasmid pBSAG3A, som inneholder α-gal A-cDNA-sekvensen i pBliescriptSK™-plasmidskjelettet. DNA-sekvensering viste at dette plasmid ikke inneholdt den komplette 5'-ende av cDNA-sekvensen. 5'-enden ble derfor rekonstruert under anvendelse av et PCR-fragment amplifisert fra human genom-DNA. For utførelse av dette ble et 268 bp genom-DNA-fragment (fig. 2, SEKV ID NR. 20) amplifisert under anvendelse av følgende oligonukleotider: 5'-ATTGGTCCGCCCCTGAGGT-3' (Oligo 3; SEKV ID NR. 3) og 5'-TGATGCAGGAATCTGGCTCT-3' (Oligo 4; SEKV ID NR. 4). Dette fragment ble subklonet i et «TA»-klonende plasmid (Invitrogen Corp., San Diego, CA) under dannelse av plasmid pTAAGEI. Plasmid pBSAG3A, som inneholder hovedandelen av α-gal A-cDNA-sekvensen, og pTAAGEI, som inneholder 5'-enden av α-gal A-cDNA, ble begge digerert med SacII og NcoI. Posisjonene for de aktuelle SacII- og NcoI-seter i det amplifiserte DNA-fragment er vist på fig. 2. SacII-NcoI-fragmentet på 0,2 kg fra pTAAGEI ble isolert og ligert til ekvivalent digerert pBSAG3A. Dette plasmid, pAGAL, inneholder den komplette α-gal A-cDNA-sekvens, innbefattende sekvensen som koder for α-gal A-signalpeptidet. cDNA ble fullstendig sekvensert (vist på fig. 3 innbefattende α-gal A-signalpeptidet; SEKV ID NR. 18) og funnet å være identisk med den publiserte sekvens for den humane α-gal A-cDNA (Genbank-sekvens HUMGALA).

Plasmidet pXAG-16 ble konstruert via flere mellomprodukter, som følger. Først ble pAGAL digerert med SacII og XhoI og gjort stump-endet. Deretter ble endene av det komplette α-gal A-cDNA ligert til XbaI-linkere og subklonet i XbaI-digerert pEF-BOS (Mizushima et al., Nucl. Acids Res. 18:5322, 1990) under dannelse av pXAG-1. Denne konstruksjon inneholder den humane granulocytt-

kolonistimulerende faktor (G-CSF) 3' UTS og den humane forlengelsesfaktor-1α-(EF-1α)-promoter som flankerer cDNA som koder for α-gal A pluss α-gal A-signal-peptidet, slik at 5'-enden av α-gal A-cDNA koples til EF-1α-promoteren. For frembringelse av en konstruksjon med CMV IE-promoteren og første intron ble α-gal A-cDNA og G-CSF 3 UTS fjernet fra pXAG-1 som et to-kb XbaI-BamHI-fragment. Fragmentet ble gjort stump-endet, ligert til BamHI-linkere og innført i BamHI-digerert pCMVflpNeo (som ble konstruert som beskrevet nedenfor). Orienteringen var slik at 5'-enden av α-gal A-cDNA ble koplet til CMV IE-promoter-området.

pCMVflpNeo ble frembrakt som følger. Et CMV IE-gen-promoterfragment ble amplifisert med PCR under anvendelse av CMV-genom-DNA som templat og oligonukleotidene: 5'-TTTTGGATCCCTCGAGGACATTGATTATTGACTAG-3' (SEKV ID NR. 23) og 5'-TTTTGGATCCCGTGTCAAGGACGGTGAC-3' (SEKV ID NR. 24). Det resulterende produkt (et 1,6 kb fragment) ble digerert med BamHI, hvorved man fikk et CMV-promoter-holdig fragment med kohesive BamHI-digererte ender. Neo-ekspresjonsenheten ble isolert fra plasmid pMC1neopA (Stratagene Inc., La Jolla, CA) som et 1,1 kb XhoI-BamHI-fragment. Det CMV-promoter-holdige fragment og neo-fragmentet ble innført i et BamHI-, XhoI-digerert plasmid (pUC12). Spesielt inneholder pCMVflpNeo CMV IE-promoter-området, som begynner ved nukleotid 546 og slutter ved nukleotid 2105 (av Genbank-sekvens HS5MIEP), og neomycinresistens-genet som drives av Herpes Simplex-virus-(HSV)-thymidinkinase-promoteren (TKneo-genet) umiddelbart 5' i forhold til CMV IE-promoterfragmentet. Retningen for transkripsjon av neo-genet er den samme som transkripsjonsretningen for CMV-promoterfragmentet. Denne mellomkonstruksjon ble kalt pXAG-4.

For addering av hGH 3' UTS ble GCSF 3' UTS fjernet fra pXAG-4 som et XbaI-SmaI-fragment, og endene av pXAG-4 ble gjort stumpe. hGH 3' UTS ble fjernet fra pXGH5 (Selden et al., Mol. Cellular Biol. 6:3173-3179, 1986) som et 0,6 kb SmaI-EcoRI-fragment. Etter at dette fragment var gjort stump-endet, ble det ligert i pXAG-4 umiddelbart etter det stump-endede XbaI-sete på pXAG-4. Dette mellomprodukt ble kalt pXAG-7. TKneo-fragmentet ble fjernet fra dette plasmid som et HindIII-ClaI-fragment, og plasmidets ender ble gjort stumpe ved «ifylling» med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I. Et neomycinresistens-gen drevet ved SV40-tidligpromoteren ble ligert inn som et stumpende-ClaI-BsmBI-fragment

fra et nedbrytningsprodukt av pcDNeo (Chen et al., Mol. Cellular Biol. 7:2745-2752, 1987), idet neo-transkripsjonsenheten ble anbrakt i samme orientering som α-gal A-transkripsjonsenheten. Dette mellomprodukt ble kalt pXAG-13.

For komplettering av pXAG-16, som har den hGH-signalpeptid-kodende sekvens på 26 aminosyrer og første intron av hGH-genet, ble et 2,0 kb EcoRI-BamHI-fragment av pXAG-13 først fjernet. Dette fragment innbefattet α-gal A-cDNA og hGH 3' UTS. Dette store fragment ble erstattet med 3 fragmenter. Det første fragment besto av et 0,3 kb PCR-produkt av pXGH5, som inneholder den hGH-signalpeptid-kodende sekvens og innbefatter første-hGH-intronsekvensen, fra et syntetisk BamHI-sete med beliggenhet like oppstrøms for Kozak-konsensus-sekvensen til enden av den hGH-signalpeptid-kodende sekvens. Følgende oligonukleotider ble anvendt til amplifisering av dette fragment (fragment 1): 5'-TTTTGGATCCACCATGGCTA-3' (Oligo HGH101; SEKV ID NR. 5) og 5'-TTTTGCCGGCACTGCCCTCTTGAA-3' (Oligo HGH102; SEKV ID NR. 6). Det annet fragment besto av et 0,27 kb PCR-produkt inneholdende sekvenser svarende til starten av cDNA som koder for α-gal A-enzymet på 398 aminosyrer (dvs. som mangler α-gal A-signalpeptidet) til NheI-setet. Følgende oligonukleotider ble anvendt til amplifisering av dette fragment (fragment 2): 5'-TTTTCAGCTGGACAATGGATTGGC-3' (Oligo AG10; SEKV ID NR. 7) og 5'-TTTTGCTAGCTGGCGAATCC-3' (Oligo AG11; SEKV ID NR. 8). Det tredje fragment besto av NheI-EcoRI-fragmentet av pXAG-7 inneholdende den gjenværende α-gal A-sekvens samt hGH 3' UTS (fragment 3).

Fragment 1 (digerert med BamHI og NaeI), fragment 2 (digerert med PvuII og NheI) og fragment 3 ble blandet med 6,5 kb BamHI-EcoRI-fragmentet av pXAG-13 inneholdende neo-genet og CMV IE-promoteren og ligert sammen under dannelse av plasmid pXAG-16 (fig. 4).

B. Konstruering av α-gal A-ekspresjonsplasmidet pXAG-28

Den humane kollagen-Iα2-promoter ble isolert for anvendelse i α-gal A-ekspresjonskonstruksjonsen pXAG-28 som følger. Et 408 bp PCR-fragment av human genom-DNA inneholdende en del av den humane kollagen-Iα2-promoter ble isolert under anvendelse av følgende oligonukleotider:

5'-TTTTGGATCCGTGTCCCATAGTGTTTCCAA-3' (Oligo 72; SEKV ID NR. 9) og 5'-TTTTGGATCCGCAGTCGTGGCCAGTACC-3' (Oligo 73; SEKV ID NR. 10).

Dette fragment ble anvendt til screening av et human-leukocytt-bibliotek i EMBL3 (Clontech Inc., Palo Alto, CA). Én positiv klon (fag 7H) inneholdende et 3,8 kb EcoRI-fragment ble isolert og klonet i pBSIISK+ (Stratagene Inc., La Jolla, CA) ved EcoRI-setet (under frembringelse av pBS/7H.2). Et AvrII-sete ble innført i pBSIISK+ ved digerering med SpeI, som spalter i pBSIISK+-polylinkeren, «ifylling» med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I, og innføring av oligonuk-leotidet 5'-CTAGTCCTAGGA-3' (SEKV ID NR. 11). Denne variant av pBSIISK+ ble digerert med BamHI og AvrII og ligert til 121 bp BamHI-AvrII-fragmentet av det opprinnelige 408 bp kollagen-Iα2-promoter-PCR-fragment beskrevet ovenfor, under dannelse av pBS/121COL.6.

Plasmidet pBS/121COL.6 ble digerert med XbaI, som spalter i pBSIISK+-polylinkersekvensen, «ifylt» med Klenow-fragmentet av DNA-polymerase I og digerert med AvrII. 3,8 kb BamHI-AvrII-fragmentet av pBS/7H.2 ble isolert og BamHI-setet gjort stump-endet ved behandling med Klenow-enzym. Fragmentet ble deretter digerert med AvrII og ligert til den AvrII-digererte vektor, hvorved kollagenpromoter-plasmidet pBS/121bpCOL7H.18 ble dannet.

Deretter ble kollagenpromoteren koplet til 5' UTS av det humane β-aktin-gen, som inneholder det første intron i det humane β-aktin-gen. For isolering av denne sekvens ble et 2 kb PCR-fragment isolert fra human genom-DNA under anvendelse av følgende oligonukleotider:
5'-TTTTGAGCACAGAGCCTCGCCT-3' (Oligo BA1, SEKV ID NR. 12) og 5'-TTTTGGATCCGGTGAGCTGCGAGAATAGCC-3' (Oligo BA2; SEKV ID NR. 13).

Dette fragment ble spaltet med BamHI og BsiHKAI under frigjøring av et 0,8 kb fragment inneholdende β-aktin 5' UTS og intronet. Et 3,6 kb SalI-SrfI-fragment ble deretter isolert fra kollagenpromoterplasmidet pBS/121bpCOL7H.18 som følger. pBS/121bpCOL7H.18 ble delvis digerert med BamHI (BamHI-setet ligger i 5'-enden av kollagen-Iα2-promoterfragmentet), gjort stump-endet ved behandling med Klenow-fragmentet, og ligert til en SalI-linker (5'-GGTCGACC-3'), hvorved et SalI-sete ble anbrakt oppstrøms for kollagen-Iα2-promoteren. Dette plasmid ble deretter digerert med SalI og SrfI (SrfI-setet ligger 110 bp oppstrøms for kollagen-

Iα2-promoter-CAP-setet), og 3,6 kb-fragmentet ble isolert. Fragmentene på 0,8 og 3,6 kb ble kombinert med SalI- og BamHI-digerert pBSIISK- (Stratagene Inc., La Jolla, CA), og et fragment som besto av følgende fire oligonukleotider, ble smeltet sammen (under dannelse av et fragment med en butt ende og en BsiHKAI-ende):

5'-GGGCCCCCAGCCCCAGCCCTCCCATTGGTGGAGGCCCTTTTGGAGG-CACCCTAGGGCCAGGAAACTTTTGCCGTAT-3' (Oligo COL-1; SEKV ID NR. 14),

5'-AAATAGGGCAGATCCGGGCTTTATTATTTTAGCACCACGGCCGCCGAG-ACCGCGTCCGCCCCGCGAGCA-3' (Oligo COL-2; SEKV ID NR. 15),

5'-TGCCCTATTTATACGGCAAAAGTTTCCTGGCCCTAGGGTGCCTCCAAAA-GGGCCTCCACCAATGGGAGGGCTGGGGCTGGGGGCCC-3' (Oligo COL-3; SEKV ID NR. 16) og 5'-CGCGGGGCGGACGCGGTCTCGGCGGCCGTGGTGC-TAAAATAATAAAGCCCGGATC-3' (Oligo COL-4; SEKV ID NR. 17).

Disse fire oligonukleotider svarer, når de er sammensmeltet, til området som begynner ved SrfI-setet på kollagen-promoteren og fortsetter gjennom BsiHKAI-setet i β-aktin-promoteren. Det resulterende plasmid ble betegnet pCOL/β-aktin.

For fullførelse av konstruksjonen av pXAG-28 ble SalI-BamHI-fragmentet av pCOL/β-aktin inneholdende kollagen-Iα2-promoteren og β-aktin 5' UTS isolert. Dette fragment ble ligert til to fragmenter fra pXAG-16 (se eksempel 1A og fig. 4): (1) 6,0 kb BamHI-fragmentet (inneholdende neo-genet, plasmidskjelettet, cDNA som koder for α-gal A-enzymet med 398 aminosyrer, og hGH 3' UTS); og (2) BamHI-XhoI-fragmentet på 0,3 kb (som inneholder SV40-poly A-sekvensen fra pcDneo). pXAG-28 inneholder den humane kollagen-Iα2-promoter koblet til den humane β-aktin 5'-UTS, hGH-signalpeptidet (som er avbrutt av hGH-første-intronet), cDNA som koder for α-gal A-enzymet, samt hGH 3' UTS. Et kart over den fullstendige ekspresjonskonstruksjon pXAG-28 er vist på fig. 5.

C. Transfektering og selektering av fibroblaster elektroporert med α-gal A-ekspresjonsplasmider

For eksprimering av α-gal A i fibroblaster ble sekundære fibroblaster dyrket og transfektert i henhold til publiserte metoder (Selden et al., WO 93/09222).

Plasmidene pXAG-13, pXAG-16 og pXAG-28 ble transfektert ved elektroporering i humane forhud-fibroblaster under dannelse av stabilt trans-

fekterte kloncellestammer, og de resulterende α-gal A-ekspresjonsnivåer ble kontrollert som beskrevet i eksempel ID. Sekresjon av α-gal A hos normale forhud-fibro-blaster er i området 2-10 enheter pr. 10^6 celler pr. 24 timer. I motsetning til dette oppviste de transfekterte fibroblaster middel-ekspresjonsnivåer som vist i tabell 1:

Tabell 1: Middel-α-gal A-ekspresjonsnivåer (+/- standardavvik)

pXAG-13:	420 +/- 344 E/10^6 celler/dag
	N = 26 klonstammer
	(område 3-1133 E/10^6 celler/dag)
pXAG-16:	2 051 +/- 1253 E/10^6 celler/dag
	N = 24 klonstammer
	(område 422-5200 E/10^6 celler/dag)
pXAG-28:	141 +/- 131 10^6 celler/dag
	N = 38 klonstammer
	(område 20-616 E/10^6 celler/dag)

Disse data viser at alle de tre ekspresjonskonstruksjoner kan øke α-gal A-ekspresjonen mange ganger i forhold til hos ikke-transfekterte fibroblaster. Ekspresjon hos fibroblaster som er stabilt transfektert med pXAG-13, og som koder for α-gal A bundet til α-gal A-signalpeptidet, var hovedsakelig lavere enn ekspresjon ved fibroblaster transfektert med pXAG-16, som bare er annerledes ved at signalpeptidet er hGH-signalpeptidet, hvis kodingssekvens er avbrutt av det første intron i hGH-genet.

Hver gang de transfekterte celler gjennomgikk en runde, ble den utsondrede α-gal A-aktivitet bestemt, cellene ble tellet og celletettheten beregnet. Basert på antallet høstede celler og tiden som fikk gå for sekresjon av α-gal A, ble den spesifikke ekspresjonshastighet for α-gal A bestemt og er angitt i tabeller 2 og 3 som utsondrede enheter (av α-gal A) pr. 10^6 celler pr. 24 timers tidsrom. Cellestammer som var ønskelige for genterapi eller for anvendelse ved dannelse av materiale for rensing av α-gal A, skulle oppvise stabil vekst og ekspresjon over

flere gjennomgåtte runder. Data fra cellestammene vist i tabeller 2 og 3, som var stabilt transfektert med α-gal A-ekspresjonskonstruksjonen pXAG-16, illustrerer det faktum at α-gal A-ekspresjon holdes stabilt i løpet av serier av gjennomgåtte runder.

Tabell 2: Vekst og ekspresjon av BRS-11-celler inneholdende α-gal A-ekspresjonskonstruksjonen pXAG-16.

BRS-11

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

Tabell 3: Vekst og ekspresjon av HF503-242-celler inneholdende α-gal A-ekspresjonskonstruksjonen pXAG-16.

HF503-242

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

D. Kvantifisering av α-gal A-ekspresjon

Aktiviteten av α-gal A-aktivitet ble målt ved anvendelse av det vannløselige substrat 4-metylumbelliferyl-α-D-galaktopyranosid (4-MUF-gal; Research Products, Inc.) ved en modifisering av protokollen beskrevet av Ioannou et al. (J. Cell Biol. 119:1137-1150, 1992). Substratet ble oppløst i substratbuffer (0,1 M citratfosfat, pH 4,6) til en konsentrasjon på 1,69 mg/ml (5 mM). Det ble typisk tilsatt 10 µl dyrkningssupernatant til 75 µl av substratløsningen. Rørene ble

tildekket og fikk inkuberes i et 37°C vannbad i 60 minutter. Ved slutten av inkuberingstidsrommet ble 2 ml glycin-karbonat-buffer (130 mM glycin, 83 mM natriumkarbonat, pH 10,6) anvendt til å stoppe reaksjonen. Den relative fluorescens av hver prøve ble målt under anvendelse av et fluorometer av typen TK0100 (Hoefer Scientific Instruments) som har en fastsatt eksitasjonsbølgelenge på 365 nm og påviser en fastsatt emisjonsbølgelengde på 460 nm. Avlesningene av prøvene ble sammenliknet med standarder tillaget av en 1 μM forrådsløsning av metylumbelliferon (Sigma Chemical Co.), og mengden hydrolysert substrat ble beregnet. Aktiviteten av α-gal A er uttrykt i enheter; én enhet α-gal A-aktivitet er ekvivalent med ett nanomol substrat hydrolysert pr. time ved 37°C. Celle-ekspresjonsdataene ble generelt uttrykt som enheter av α-gal A-aktivitet utsondret pr. 10^6 celler pr. 24 timer. Denne analyse ble også anvendt til måling av mengden α-gal A-aktivitet i cellelysater og i prøver fra forskjellige α-gal-rensetrinn, som omtalt nedenfor.

Eksempel II. Rensing av α-gal A fra det kondisjonerte medium av stabilt transfekterte humancellestammer

Eksempler IIA-IIE illustrerer at α-gal A kan renses til nær homogenitet fra det kondisjonerte medium av dyrkede humancellestammer som er blitt stabilt transfektert for produksjon av enzymet.

A. Anvendelse av Butyl Sepharose®-kromatografi som et første trinn ved rensing av α-gal A

Kaldt kondisjonert medium (1,34 liter) ble klaret ved sentrifugering og filtrert gjennom et 0,45 μm celluloseacetatfilter under anvendelse av glassfiber-forfiltre. Under omrøring ble pH i det kalde, filtrerte medium justert til 5,6 ved dråpevis tilsetting av 1 N HCl, og ammoniumsulfat ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,66 M ved dråpevis tilsetting av en forrådsløsning (romtemperatur) av 3,9 M ultrarent ammoniumsulfat. Mediet ble omrørt i ytterligere 5 minutter ved 4°C, filtrert som før og påsatt på en hurtigstrømningskolonne av typen Butyl Sepharose® 4 (81 ml kolonnevolum, 2,5 x 16,5 cm; Pharmacia, Uppsala, Sverige) som var blitt ekvilibrert i 10 mM MES-Tris, pH 5,6, inneholdende 0,66 M ammoniumsulfat (buffer A). Kromatografien ble utført ved 4°C på et Gradi-Frac™-system

(Pharmacia, Uppsala, Sverige) utstyrt med «in-line»-UV (280 nm) og ledingsevne-monitorer for bedømmelse av henholdsvis totalprotein- og saltkonsentrasjon. Etter prøve-påføring ved en strømningshastighet på 10 ml/min, ble kolonnen vasket med 10 kolonnevolum av buffer A. α-gal A ble eluert fra Butyl Sepharose®-kolonnen med en 14 kolonnevolum lineær gradient fra buffer A (inneholdende ammoniumsulfat) til 10 mM MES-Tris, pH 5,6 (intet ammoniumsulfat). Fraksjonene ble analysert med hensyn til α-gal A-aktivitet ved hjelp av 4-MUF-gal-analysen, og de som inneholdt vesentlige mengder enzymaktivitet, ble blandet. Som det vil sees av fig. 6 og rense-oppsummeringen (tabell 3), fjerner dette trinn ca. 99% av det forurensende protein (før-kolonne-prøve = 8,14 g totalprotein; etterkolonne-prøve = 0,0638 g totalprotein).

Tabell 4: Rensing av α-gal A fra det kondisjonerte medium av stabilt transfekterte humane fibroblaster

Rensetrinn	Volum (ml)	α-gal A-aktivitet (x 10^6 enheter)	Totalprotein (mg)	Spesifikk aktivitet (x 10^6 enheter pr mg)	Gangers rensing (kumulativt)	Prosent gjenvinning
Dyrknings-supernatant	1340	14,6	8140	0,0018	=1	=100
Butyl Sepharose®	417	14,1	63,8	0,221	123	96,6
Heparin Sepharose®	134	12,1	14,6	0,829	436	82,9
Hydroksy-apatitt	47	9,73	4,46	2,18	1220	66,6
Q Sepha-rose®	31,5	8,91	3,31	2,69	1503	61,0
Superdex® 200	10	8,58	2,93	2,92	1634	59,0

B. Anvendelse av Heparin Sepharose®-kromatografi som et trinn for rensing av α-gal A

Toppfraksjonene fra Butyl Sepharose®-kolonnen ble dialysert ved 4°C mot (4 liter) 10 mM MES-Tris, pH 5,6 (utskiftet én gang). Dialysatet ledingsevne ble justert til 1,0 mMHO ved 4°C ved tilsetting av H_2O eller NaCl etter behov. Deretter ble prøven påsatt på en hurtigstrømnings-kolonne av typen Heparin Sepharose® (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 29 ml kolonnevolum, 2,5 x 6 cm) som var blitt ekvilibrert i 10 mM MES-Tris, pH 5,6, inneholdende 9 mM NaCl (buffer B). Dette ble utført ved 4°C ved en strømningshastighet på 10 ml/min. «In-line»-UV- (280 nm) og ledingsevne-monitorer målte totalprotein- og saltkonsentrasjon. Etter at prøven var påsatt, ble kolonnen vasket med 10 kolonnevolum av buffer B, fulgt av en 3 kolonnevolum lineær gradient til 8% buffer C/92% buffer B (hvor buffer C er 10 mM MES-Tris, pH 5,6, inneholdende 250 mM NaCl) og en 10 kolonnevolum vaskeløsning med 8% buffer C. Dette ble fulgt av eluering av α-gal A med en 1,5 kolonnevolum lineær gradient til 29% buffer C og en påfølgende 10 kolonnevolum lineær gradient til 35% buffer C. Fraksjonene ble analysert med hensyn til α-gal A-aktivitet, og de som inneholdt vesentlige mengder aktivitet, ble blandet.

C. Anvendelse av hydroksyapatitt-kromatografi som et trinn for rensing av α-gal A

Heparinblandingen ble filtrert og påsatt direkte på en kolonne av Ceramic Hydroxyapatite HC (40 µm; American International Chemical, Natick, MA; 12 ml kolonnevolum, 1,5 x 6,8 cm) som var blitt ekvilibrert i 1 mM natriumfosfat, pH 6,0 (buffer D). Kromatografien ble utført ved romtemperatur på et hybrid GradiFrac™/FPLC®-system (Pharmacia, Uppsala, Sverige) utstyrt med «in-line»-UV (280 nm) og ledingsevne-monitorer. Etter at prøven var påsatt (5 ml/min), ble kolonnen vasket med 10 kolonnevolum av buffer D. α-gal A ble eluert med en 7 kolonnevolum lineær gradient til 42% buffer E/58% buffer D (hvor buffer E er 250 mM natriumfosfat, pH 6,0), fulgt av en 10 kolonnevolum gradient til 52% buffer E. Fraksjonene ble analysert med hensyn til α-gal A-aktivitet, og fraksjonene som inneholdt vesentlig aktivitet, ble blandet.

D. Anvendelse av Q Sepharose® anionbytter-kromatografi som et trinn for rensing av α-gal A

Hydroksyapatitt-blandingen ble fortynnet omtrent 1,5 ganger med H_2O til en slutt-ledningsevne på 3,4-3,6 mMHO ved romtemperatur. Etter filtrering ble prøven

påsatt på en kolonne av Q Sepharose® HP (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 5,1 ml kolonnevolum, 1,5 x 2,9 cm) ekvilibrert i 10% buffer G/90% buffer F, hvor buffer F er 25 M natriumfosfat, pH 6,0, og buffer G er 25 mM natriumfosfat, pH 6,0, 250 mM NaCl. Kromatograferingen ble utført ved romtemperatur på Gradi-Frac™/-FPLC®-hybridsystemet (Pharmacia, Uppsala, Sverige), og totalprotein- og saltkonsentrasjon ble kontrollert ved hjelp av «in-line»-monitorene. Prøven ble påsatt ved en strømningshastighet på 5 ml/min, og deretter ble følgende trinn utført: (1) en vasking med 5 kolonnevolum 10% buffer G, (2) en vasking med 7 kolonnevolum 12% buffer G, (3) en lineær gradient (3 kolonnevolum) til 50% buffer G, (4) en lineær gradient (10 kolonnevolum) til 53% buffer G, (5) en lineær gradient (3 kolonnevolum) til 100% buffer G, (6) en vasking med 10 kolonnevolum 100% buffer G. α-gal A ble hovedsakelig eluert i løpet av trinnene 3 og 4. Fraksjoner som inneholdt vesentlig aktivitet, ble blandet («Q-blandingen»).

E. Anvendelse av Superdex®-200 gelfiltreringskromatografi som et trinn for rensing av α-gal A

Q-blandingen ble konsentrert ca. 5 ganger under anvendelse av sentrifuge-konsentrator-enheter av typen Centriprep®-10 (Amicon, Beverly, MA) og påsatt på en kolonne av Superdex® 200 (Pharmacia, Uppsala, Sverige; 189 ml kolonne-volum, 1,6 x 94 cm). Kolonnen ble ekvilibrert og eluert med 25 mM natriumfosfat, pH 6,0, inneholdende 150 mM NaCl. Kromatograferingen ble utført på et FPLC®-system (Pharmacia, Uppsala, Sverige) ved romtemperatur under anvendelse av en «in-line» UV-monitor (280 nm) til å følge elueringen av proteinet. Volumet av prøven som ble påsatt på kolonnen, var ≤ 2 ml, strømningshastigheten var 0,5 ml pr. min og fraksjonsstørrelsen var 2 ml. Det ble utført multiple kolonnekjøringer; fraksjonene ble analysert med hensyn til α-gal A-aktivitet, og fraksjoner som inneholdt vesentlige aktivitetsmengder, ble blandet.

De blandede fraksjoner fra Superdex® 200-kolonnen ble konsentrert under anvendelse av Centriprep-10-enheter, delt i porsjoner, hurtigfrosset og oppbevart ved -80°C i korte tidsrom. En oppsummering av dette eksempel på α-gal A-rensing er vist i tabell 3. Slutt-utbyttet av α-gal A var 59% av aktiviteten av utgangsmaterialet, og den spesifikke aktivitet av det rensede produkt var 2,93 x 10^6 enheter pr. mg protein. Det resulterende produkt viste et høyt nivå av renhet

etter elektroforese under reduserende betingelser på 4-15% SDS-polyakrylamidgel, som deretter ble sølvfarget.

Eksempel III. Utforming og oppbevaring av renset α-gal A

Grundig renset α-gal A er ikke stabilt i lengre tidsrom ved lagring som fortynnet løsning av renset protein (≤ 1 mg protein pr. ml). Det ble derfor oppfunnet en utformning for forbedring av stabiliteten under langvarig lagrig, dvs. lagring som varte i fra flere uker til minst flere måneder. Det rensede enzym ble konsentrert til minst 1 mg/ml med anvendelse av en sentrifuge-konsentrator (i enzymbuffer bestående av 25 mM natriumfosfat (pH 6,0) og 150 mM NaCl). Humant serumalbumin (HSA; Buminate®, Baxter-Hyland) ble tilsatt til en slutt-konsentrasjon på 2,5 mg/ml. Proteinløsningen ble deretter sterilfiltrert under anvendelse av et 0,2 µm celluloseacetatfilter (Schleicher og Schuell) knyttet til en sprøyte. α-gal A-løsningen ble fordelt i sterile, pyrogenfrie medisinglass, forseglet med Teflon-deksel, hurtigfrosset og lagret ved -20°C.

Stabiliteten av α-gal A-aktiviteten ble vurdert over et tidsrom på 3 måneder under anvendelse av 4-MUF-gal-analysen. Dataene vist i tabell 5 viser at det ikke var noe tap av enzymaktivitet i løpet av testperioden. Den sure pH i preparatet (< 6,5) er avgjørende for stabiliteten av det grundig rensede enzym.

Tabell 5: Stabilitet av utformet α-gal A ved -20°C

Prøve	Spesifikk aktivitet (enheter pr. mg totalprotein)
tid 0	$2{,}24 \times 10^6$ +/- $0{,}33 \times 10^6$
uke 1	$2{,}40 \times 10^6$ +/- $0{,}25 \times 10^6$
uke 2	$2{,}42 \times 10^6$ +/- $0{,}21 \times 10^6$
uke 3	$2{,}37 \times 10^6$ +/- $0{,}05 \times 10^6$
måned 1	$2{,}39 \times 10^6$ +/- $0{,}16 \times 10^6$
måned 2	$2{,}31 \times 10^6$ +/- $0{,}26 \times 10^6$
måned 3	$2{,}29 \times 10^6$ +/- $0{,}17 \times 10^6$

Eksempel IV. α-gal A dannet av humane cellestammer er egnet for behandling av α-gal A-mangel

De strukturelle og funksjonelle egenskaper hos renset α-gal A fremstilt i henhold til oppfinnelsen ble undersøkt for å påvise at DNA-molekylene beskrevet i det foreliggende og de tilsvarende eksprimerte glykoproteiner dannet av transfekterte humane cellestammer kan anvendes ved henholdsvis gen- eller enzym-erstatningsterapier.

A. Størrelse av α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane celler i kultur

Molekylmassen av α-gal A ble vurdert ved hjelp av MALDI-TOF-masse-spektrometri. Disse resultater viser at dimerens molekylmasse er 102 353 Da, mens monomerens molekylmasse er 51 002 Da. Den ventede molekylmasse for monomeren, basert på aminosyresammensetningen, er 45 400 Da. Man kan derfor trekke den slutning av karbohydrat-innholdet i enzymet utgjør opp til 5 600 Da av molekylvekten.

Resultatene av standard-aminosyreanalyse utført for det rensede protein er i overensstemmelse med den konklusjon at proteinet dannet av transfekterte humane celler er identisk med proteinet renset fra humant vev på aminosyre-nivået.

B. N-Terminal bearbeiding av α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane celler

Den humane α-gal A-cDNA-nukleotidsekvens koder for 429 aminosyrer. De 31 N-terminale aminosyrer utgjør en signalpeptid-sekvens, som spaltes etter hvert som proteinet som er under utvikling, går gjennom membranen i det endoplasmatiske retikulum (LeDonne et al., Arch. Biochem. Biophys. 224:186, 1983; Lemansky et al., J. Biol. Chem. 262:2062, 1987). For å bekrefte at α-gal A var tilbørlig bearbeidet ved tilknytting til en heterolog signalpeptid-sekvens (for eksempel den humane veksthormon-signalsekvens) og eksprimert i transfekterte humane fibroblaster, ble ti N-terminale aminosyrer i det utsondrede protein mikrosekvensert. Prøver ble kjørt i elektroforese ved hjelp av SDS-PAGE og overført til ProBlott® (ABI, Foster City, CA) under anvendelse av et buffersystem av 10 mM CAPS (pH 11,0), 10% metanol. Proteinet på ProBlott® ble visualisert ved hjelp av Coomassie-farging, og et bånd med passende størrelse (50 kDa) ble utskåret. N-terminal sekvens ble oppnådd ved anvendelse av en puls-væskefase-aminosyre-sekvensanalysator av typen Applied Biosystems som utfører automatisert Edman-nedbryting. Den oppnådde N-terminale sekvens,

LDNGLARTPT (SEKV ID NR. 28), er i overensstemmelse med riktig spalting av signalpeptidet, og er tilpasset den N-terminale sekvens som er forutsett for det utsondrede protein.

C. C-Terminal aminosyre av α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane celler

Den C-terminale aminosyrerest av utsondret α-gal A fremstilt i henhold til oppfinnelsen ble identifisert under anvendelse av en automatisk C-terminal-sekvensanalysator av typen Hewlett Packard. Resultatene viste en leucinrest i den C-terminale ende, noe som er i overensstemmelse med den C-terminale aminosyre forutsett ved DNA-sekvensen.

D. Karbohydrat-modifisering av α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane celler

Glykosyleringsmønsteret for α-gal A fremstilt i henhold til oppfinnelsen ble også vurdert. Riktig glykosylering er viktig for optimal in vivo-aktivitet av α-gal A; α-gal A eksprimert i ikke-glykosyleringssystemer er inaktivt eller ustabilt (Hantzopolous et al., Gene 57:159, 1987). Glykosylering er også viktig for internalisering av α-gal A i de ønskede målceller, og påvirker sirkulasjons-halveringstiden for enzymet in vivo. På hver subenhet av α-gal A er fire seter tilgjengelig for addisjon av asparagin-tilknyttede karbohydratkjeder, blant hvilke bare tre er opptatt (Desnick et al., i *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* s. 2741-2780, McGraw Hill, New York, 1995).

En prøve av α-gal A dannet av stabilt transfekterte celler ble behandlet med neuraminidase, som isoleres fra A. urafaciens, (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) for fjerning av sialinsyre. Denne reaksjon ble utført ved behandling av 5 µg α-gal A over natten med 10 mE neuraminidase ved romtemperatur i et totalt volum på 10 µl acetatbufret saltoppløsning (ABS, 20 mM natriumacetat, pH 5,2, 150 mM NaCl).

Renset α-gal A dannet av stabilt transfekterte celler ble også defosforylert under anvendelse av alkalisk fosfatase (intestinal alkalisk kalve-fosfatase, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) ved behandling av 5 µg α-gal A over natten ved romtemperatur med 15 E alkalisk fosfatase i ABS (pH øket til 7,5 med 1 M Tris).

Prøvene ble analysert ved hjelp av Western blot med et α-gal A-spesifikt antistoff. Det anvendte antistoff var et polyklonalt kanin-antipeptid-antistoff, som ble fremstilt under anvendelse av et peptid som representerte aminosyrene 68-81 i α-gal A som immunogen. Etter overføring av proteinet til PVDF (Millipore, Bedford, MA), ble membranen undersøkt med en 1:2000 fortynning av antiserumet i 2,5% blotto (ikke-fet tørrmelk i 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,05% Tween-20). Dette ble fulgt av påvisning med geit-antikanin-IgG konjugert til pepperrot-peroksidase (Organon Teknika/Cappel, Durham, NC; 1:5000 fortynning) og reagenser i ECK-kjemiluminescens-settet (Amersham, Arlington Heights, IN).

Behandling av α-gal A med neuraminidase resulterer i en liten skifting i molekylmasse (omtrent 1500-2000 Da eller 4-6 sialinsyrer pr. monomer), noe som tyder på at det er omfattende modifikasjon av α-gal A med sialinsyre. For referanse har plasmaformen av α-gal A 5-6 sialinsyre-rester pr. monomer, og placentaformen har 0,5-1,0 sialinsyrerester pr. monomer (Bishop et al., J. Biol. Chem. 256:1307, 1981).

En annen metode som ble anvendt for undersøkelse av sialinsyre- og mannose-6-fosfat-modifikasjonene av α-gal A, var isoelektrisk fokusering (IEF), hvor prøvene separeres på basis av sitt isoelektriske punkt (pI) eller nettoladning. Således er det ventet at fjerning av ladede rester så som sialinsyre eller fosfat fra α-gal A vil forandre proteinets mobilitet i IEF-systemet.

For utførelse av IEF-forsøket ble prøver av α-gal A fremstilt ifølge oppfinnelsen behandlet med nauraminidase og alkalisk fosfatase, blandet 1:1 med 2X Novex-prøvebuffer (med 8 M urea, pH 3,0-7,0), og påsatt på en 6 M urea IEF-gel (5,5% polyakrylamid) laget under anvendelse av Pharmalyte® (Pharmacia, Uppsala, Sverige; pH 3,0-6,5; Pharmalyte® 4-6,5 og 2,5-5,5, 0,25 ml av hver pr. gel). Standarder for isolektrisk punkt (Bio-Rad) ble også medtatt. Etter elektroforese ble gelen overført til PVDF, og Western blot-analyse ble utført som beskrevet ovenfor.

α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane fibroblaster besto av tre hoved-isoformer med et pI-område på ca. 4,4-4,65. Disse verdier er lik pI'ene for plasma- og miltformene av α-gal A (Bishop et al., J. Biol. Chem. 256:1307, 1981). Neuramidase-behandling av enzymet økte pI for alle tre isoformer, noe som viste at alle i en viss grad ble modifisert av sialinsyre. Disse data tyder på at α-gal A

dannet av stabilt transfekterte humane celler skulle ha en ønskelig plasma-halveringstid, noe som viser at dette materiale er godt egnet for farmakologisk anvendelse. Videre økte behandling av neuraminidase-behandlet α-gal A med alkalisk fosfatase ytterligere pI for en del av proteinet til ca. 5,0-5,1, noe som viser at enzymet bærer én eller flere mannose-6-fosfat-rester. Denne modifisering er betydelig ved at den er nødvendig for effektiv internalisering av α-gal A i målcellene.

E. Spesifikk aktivitet av α-gal A renset fra stabilt transfekterte fibroblaster

Potensen eller den spesifikke aktivitet av renset α-gal A beregnes ved måling av både den katalytiske aktivitet av enzymet (med 4-MUF-gal-analysen) og proteinkonsentrasjonen. Proteinkonsentrasjonen kan bestemmes ved hjelp av hvilken som helst standardmetode, så som med BCA-systemet (Pierce) eller ved måling av absorbansen ved 280 nm og under anvendelse av mg/ml-ekstinksjons-koeffisienten på 2,3 (bestemt ut fra aminosyreanalyse) til beregning av verdien. Ved anvendelse av disse teknikker er den spesifikke aktivitet for α-gal A renset fra det kondisjonerte medium for transfekterte humane fibroblaster 2,2-2,9 x 10^6 enheter pr. mg protein, noe som er sammenliknbart med den spesifikke aktivitet av α-gal A som er renset fra humant vev (Bishop et al., J. Biol. Chem. 256:1301, 1981).

F. Mannose- eller mannose-6-fosfat-formidlet internalisering av α-gal A

For at α-gal A dannet av stabilt transfekterte celler skal kunne være et effektivt terapeutisk middel ved α-gal A-mangler, må enzymet internaliseres av de angrepne celler. α-gal A er ikke aktivt ved fysiologiske pH-nivåer, og det er usannsynlig at det er effektivt i blod- eller interstitial-fluidene. Det metaboliserer opphopede lipidsubstrater optimalt bare når det er internalisert i det sure miljø i lysosomet. Denne internalisering formidles ved binding av α-gal A til mannose-6-fosfat-(M6P)-reseptorer, som eksprimeres på celleoverflaten og avgir enzymet til lysosomet via den endocytiske vei. M6P-reseptoren eksprimeres over alt, de fleste somatiske celler eksprimerer den i en viss grad. Mannose-reseptoren, som er spesifikk for eksponerte mannoserester på glykoproteiner, er mindre fremtredende. Sistnevnte reseptorer finnes generelt bare på makrofager og makro-

fagliknende celler, og gir et ytterligere hjelpemiddel for α-gal A-inngang i disse celletyper.

For påvisning av M6P-formidlet internalisering av α-gal A ble hud-fibroblaster fra en pasient med Fabrys sykdom (NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository) ble dyrket over natten i nærvær av økende konsentrasjoner av renset α-gal A ifølge oppfinnelsen. En del av prøvene inneholdt 5 mM løselig M6P, som kompetitivt inhiberer binding til, og som et resultat, internalisering av, mannose-6-fosfat-reseptoren. Andre prøver inneholdt 30 µg/ml mannan, som inhiberer binding til, og som et resultat, internalisering av, mannosereseptoren. Etter inkubering ble cellene vasket og høstet ved skraping i lysebuffer (10 mM Tris, pH 7,2, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM Pefabloc™ (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) og 1% NP-40). De lyserte prøver ble deretter analysert med hensyn til proteinkonsentrasjon og α-gal A-aktivitet. Resultatene er uttrykt som enheter α-gal A-aktivitet pr. mg celleprotein. Fabry-cellene internaliserte α-gal A på en doseavhengig måte (fig. 7). Denne internalisering ble inhibert med mannose-6-fosfat, men det var ingen inhibering med mannan. Internalisering av α-gal A i Fabry-fibroblaster formidles derfor ved mannose-6-fosfat-reseptoren, men ikke ved mannose-reseptoren.

α-gal A blir også internalisert in vitro av endotelceller, viktige målceller for behandlingen av Fabrys sykdom. Humane navlevene-endotelceller (HUVEC'er) ble dyrket over natten med 7500 enheter α-gal A; noen av brønnene inneholdt M6P. Etter inkuberingstidsrommet ble cellene høstet og analysert med hensyn til α-gal A som beskrevet ovenfor. Cellene som var inkubert med α-gal A, hadde bare enzymnivåer som var nesten 10 ganger over nivåene for kontroll-celler (ingen inkubering med α-gal A). M6P inhiberte den intracellulære opphoping av α-gal A, noe som tyder på at internaliseringen av α-gal A ved hjelp av HUVEC'er formidles ved M6P-reseptoren. Således internaliseres det humane α-gal A ifølge oppfinnelsen ved hjelp av klinisk aktuelle celler.

Få dyrkede humancellelinjer er kjent for å eksprimere mannose-reseptoren. Imidlertid kan en musemakrofag-liknende cellelinje (J774.E) som bærer mannose-reseptorer, men få, hvis noen, mannose-6-fosfat-reseptorer, anvendes til bestemmelse av om hvorvidt renset α-gal A ifølge oppfinnelsen internaliseres via mannosereseptoren (Diment et al., J. Leukocyte Biol. 42:485-490, 1987). J774.E-

celler ble dyrket over natten i nærvær av 10 000 enheter/ml α-gal A. Utvalgte prøver inneholdt også 2 mM M6P, og andre inneholdt 100 µg/ml mannan. Cellene ble vasket og høstet som beskrevet ovenfor, og totalproteinet og α-gal A-aktiviteten for hver prøve ble bestemt. Resultatene er vist i tabell 5. M6P inhiberer ikke opptaket av α-gal A hos disse celler, mens mannan reduserer de opphopede α-gal A-nivåer med 75%. Således kan α-gal A ifølge oppfinnelsen internaliseres ved hjelp av mannosereseptoren i celletyper som eksprimerer denne spesielle celleoverflate-reseptor.

Tabell 6. Internalisering av α-gal A i J774.E-celler.

α-gal A-aktivitet (enheter pr. mg totalprotein)

	Ingen tilsetninger	+ α-gal A	+ α-gal A, + M6P	+ α-gal A, + mannan
J774.E	409 ± 25	6444 ± 554	6297 ± 674	1654 ± 323

[mannan] = 100 µg/ml

[M6P] = 2 mM eller 660 µg/ml

Disse forsøk viser at α-gal A dannet av stabilt transfekterte humane celler kan internaliseres av celler via mannose- eller mannose-6-fosfat-reseptoren.

G. Korrigering av Fabry-fibroblaster med humane fibroblaster som eksprimerer α-gal A

For genterapi må et implantat av autologe celler som danner α-gal A, danne enzymet i en form som er hensiktsmessig modifisert for «korrigering» av α-gal A-mangelen hos målceller. For vurdering av effekten av α-gal A-dannelse av transfekterte humane fibroblaster, på Fabry-celler, ble fibroblaster høstet fra pasienter med Fabrys sykdom (NIGMS Human Genetics Mutant Cell Repository) dyrket sammen med en α-gal A-dannende cellestamme (BRS-11) i Transwells® (Costar, Cambridge, MA). Forsøksskjemaet er vist på fig. 8. Fabryceller ble dyrket i 12-brønns-vevskulturskåler, og noen av dem inneholdt innskudd (Transwells®, 0,4 µm porestørrelse) med en overflate på hvilke celler kan dyrkes.

Vekstmatriksen i innskuddet er porøs og gir mulighet for at makromolekyler kan passere fra det øvre til det nedre miljø. Ett sett av innskudd inneholdt fibroblaster fra normal human forhud (HF), som utsondrer minimale nivåer av α-gal A, mens et annet sett inneholdt den stabilt transfekterte humane fibroblaststamme, BRS-11, som utsondrer store mengder α-gal A. I brønnene som er sam-dyrket med α-gal A-dannende celler, kan α-gal A kommer inn i mediet som Fabry-cellene finnes i, og potensielt internaliseres av Fabry-cellene.

Dataene i tabell 7 viser at Fabry-celler internaliserte det utsondrede α-gal A. De intracellulære nivåer av α-gal A ble kontrollert i tre dager. Cellene som ble dyrket alene (intet innskudd) eller i nærvær av ikke-transfekterte forhud-fibroblaster (HF-innskudd), hadde meget lave intracellulære nivåer av α-gal A-aktivitet. Fabry-cellene som var dyrket med de α-gal A-dannende (BRS-11-innskudd) celler, oppviste imidlertid enzymnivåer i likhet med nivåene hos normale celler ved slutten av dag 2 (normale fibroblaster har 25-80 enheter α-gal A pr. mg protein). At korrigeringen skyldes α-gal A opptatt via M6P-reseptoren, vises ved dens inhibering med mannose-6-fosfat (BRS-11-innskudd + M6P).

Tabell 7. Korrigering av Fabry-fibroblaster ved hjelp av humane fibroblaster som eksprimerer α-gal A

α-gal A-aktivitet (enheter pr. mg totalprotein)

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

H. Anvendelse av andre celletyper

Andre celletyper kan anvendes ved fremgangsmåten beskrevet i det foreliggende. Cellene kan fås fra mange forskjellige vev og innbefatter alle celletyper som kan holdes i kultur. For eksempel innbefatter primære og

sekundære celler som kan transfekteres ved hjelp av foreliggende metode, humane fibroblaster, keratinocytter, epitelceller (f.eks. bryst- eller intestinal-epitelceller), endotelceller, gliaceller, nerveceller, formede elementer i blodet (f.eks. lymfocytter og benmargsceller), muskelceller, samt forløpere for disse somatiske celletyper. Fibroblaster er spesielt aktuelle. Primære celler tas fortrinnsvis fra individet som de transfekterte primære og sekundære celler skal administreres til, slik at de ikke skal forkastes av pasientens immunsystem. Hvis man imidlertid er tilstrekkelig oppmerksom på å unngå eller undertrykke immun-forkastelse (som beskrevet nedenfor), kan det også anvendes celler fra en annen human donor enn pasienten. Dette vil muliggjøre anvendelse av celler fra en standardisert, anerkjent, stabilt transfektert cellelinje for alle pasienter.

I. Administrering av α-gal A-eksprimerende celler

Cellene beskrevet ovenfor kan innføres i et individ via forskjellige standardiserte administreringsmåter slik at de for eksempel vil holde til i nyre-subkap-selen, et subkutant rom, sentralnervesystemet, mellomkapselrommet («the intra-thecal space»), leveren, intraperiotonealhulen, eller i en muskel. Cellene kan også injuseres intravenøst eller intra-arterielt slik at de sirkulerer i individets blodstrøm. Straks de transfekterte celler er implantert i individet, vil de danne og utsondre det terapeutiske produkt, glykosylert humant α-gal A.

Antallet genetisk modifiserte celler som vil bli innført i individet, vil variere, men kan bestemmes av fagfolk på området. Hver pasients alder, vekt, kjønn og generelle fysiske tilstand, samt fordelingsvolumet, halveringstiden og biotilgjengeligheten av enzymet og produktiviteten av de genetisk modifiserte celler in vivo vil være blant de primære hensyn ved bestemmelse av dosering og administreringsmåte. Det vil typisk bli anvendt mellom én million og én billion celler, med ekspresjonsnivåer i området fra 100 til 100 000 enheter pr. 10^6 celler pr. dag. Hvis nødvendig, kan fremgangsmåten gjentas eller modifiseres til det ønskede resultat, for eksempel befrielse fra symptomene som er forbundet med Fabrys sykdom, oppnås.

Som beskrevet ovenfor, vil de anvendte celler vanligvis være pasient-spesifikke, dvs. tatt fra individet som de transfekterte primære eller sekundære celler skal administreres til, slik at de ikke skal forkastes av pasientens

immunsystem. Hvis imidlertid disse forhold ikke er mulige eller ønskelige, kan celler fås fra et annet individ, genetisk modifisert som beskrevet i det foreliggende, og implanteres i pasienten som lider av α-gal A-mangel.

Anvendelse av celler fra et annet individ enn mottakeren kan fordre administrering av et immunundertrykkende middel, forandring av histokompatibilitetsantigener eller anvendelse av en barriere-innretning til forhindring av forkastelse av de implanterte celler. Barriere-innretningen vil være laget av et materiale (f.eks. en membran så som XM-50 fra Amicon, Beverly, MA) som muliggjør at det utsondrede produkt kan passere inn i mottakerens sirkulasjon eller vev, men som forhindrer kontakt mellom de implanterte celler og mottakerens immunsystem, og således forhindres en immunrespons overfor (og eventulle forkastelse av) cellene hos mottakeren. For ytterligere veiledning angående genterapi, se Selden et al. (WO 93/09222).

Cellene kan alternativt være innleiret i en matriks eller et gelmateriale, så som beskrevet i sam-eid US-patentsøknad 08/548/002, som beskriver anvendelse av hybridmatriksimplantater, eller i Jain et al. (PCT-patentsøknad WO 95/19430), som beskriver makroinnkapsling av sekretoriske celler i et hydrofilt gelmateriale.

J. Farmasøytisk preparat for konvensjonell administrering av α-gal A-protein

α-gal A-proteinet som er eksprimert og utsondret av stabilt transfekterte (eller på annen måte genetisk modifiserte) humane celler og renset som beskrevet i det foreliggende, kan administreres til individer som danner utilstrekkelig eller mangelfullt α-gal A-protein. Proteinet kan administreres i en farmasøytisk akseptabel bærer, ved en pH på under 6,5, f.eks. i et preparat som beskrevet i eksempel III. Eksempler på eksipienser som kan innarbeides med preparatet, er buffere så som citratbuffer, fosfatbuffer, acetatbuffer og bikarbonatbuffer, amino-syrer, urea, alkoholer, askorbinsyre, fosfolipider, proteiner så som serumalbumin og gelatin, EDTA, natriumklorid, liposomer, polyvinylpyrrolidon, mannitol, sorbitol, glycerol, propylenglykol og polyetylenglykol (f.eks. PEG-4000, PEG-6000). Administreringsmåten kan for eksempel være intravenøs, intra-arteriell, subkutan, intraperitoneal, intracerebral, intramuskulær, intrapulmonær eller transmukosal. Administreringsmåten og mengden av avgitt protein vil bestemmes av faktorer som er godt innenfor fagfolks evne å bedømme. Videre er fagfolk på området klar

over at administreringsmåten og doseringen av et terapeutisk protein kan varieres for en gitt pasient til det er oppnådd et terapeutisk doseringsnivå. Det vil typisk bli administrert doser av α-gal A på 0,01-100 mg pr. kg kroppsvekt. Det er ventet at regelmessig gjentatte doser av proteinet vil være nødvendig i hele pasientens liv.

K. Behandling av andre tilstander forårsaket av enzymmangler

Det er sannsynlig at andre tilstander forårsaket av mangler ved andre lysosomlagrings-enzymer enn α-gal A vil påvirkes ved behandling med metoder som er sammenliknbare med metodene beskrevet i det foreliggende. I disse tilfeller vil DNA som koder for α-gal A i ekspresjonskonstruksjonene beskrevet i det foreliggende, bli erstattet med DNA som koder for en funksjonell form av det mangelfulle enzym. Eksempler på enzymmangelsyndromer som er blitt identifisert, og som kan påvirkes ved behandling som beskrevet i det foreliggende, er vist i tabell 8. Informasjonen i denne tabell er tatt fra E. Neufeld (Ann. Rev. Biochem. 60:257-280, 1991).

Tabell 8. Oppsummering av lysosomlagrings-sykdommer

Sykdom	Primær mangel [sekundær mangel]
Sykdommer med sfingolipid-nedbrytning	
Fabrys sykdom	α-galaktosidase
Farbers sykdom	ceramidase
Gauchers sykdom	glokocerebrosidase
G_{M1}-gangliosidose	β-galaktosidase
G_{M2}-gangliosidose	β-heksosaminidase, α-subenhet
Tay-Sachs sykdom	[heksosaminidase A]
Sandhoffs sykdom	β-heksosaminidase, β-subenhet [heksosaminidaser A og B]
Aktivatormangel	G_{M2}-aktivator
Krabbes sykdom	galaktosylceramidase

Metakromatisk leukodystrofi-enzym-	
mangel-form	arylsulfatase A
aktivatormangel-form	sulfatid-aktivator/saposin
Mucolipidose IV	primær defekt ukjent [gangliosid-sialidase]
Multippel sulfatase-mangel	primær defekt ukjent [mangel på alle sulfataser]
Niemann-Pick-sykdom	sfingomyelinase
Schindlers sykdom	α-N-acetylgalaktosaminidase

Forstyrrelser ved glykoproteinnedbrytningen

Aspartylglykosaminuri	aspartylglykosaminidase
Fukosidose	α-L-fukosidase
Galaktosialidose	beskyttende protein/cathepsin [β-galaktosidase og sialidase]
α-Mannosidose	α-mannosidase
β-mannosidose	β-manosidase
Sialidose	sialidase

Forstyrrelser ved glykosaminoglykan-nedbrytningen

Hunters syndrom	iduronatsulfatase
Hurler og Scheies syndromer	α-L-iduronidase
Maroteaux-Lamys syndrom	GalNAc 4-sulfatase/arylsulfatase
Morquios syndrom	
A-subtype	Gal 6-sulfatase
B-subtype	β-galaktosidase
Sanfilippos syndrom	
A-subtype	heparan-N-sulfatase
B-subtype	α-N-acetylglukosaminidase
C-subtype	AcetylCoA: glukosamin-N-acetyltransferase
D-subtype	GlcNAc-6-sulfatase

Slys syndrom	β-glukuronidase

Andre enkeltenzymmangel-forstyrrelser

Pompes sykdom (glykogenose II)	α-glukosidase
Wolmans sykdom	syrelipase

Forstyrrelser av lysosomalenzym-biosyntese

I-cellesykdom og pseudoHurler	6-fosfo-N-acetylglukosamin-transferase-polydystrofi [dislokalisasjon av mange lysosomal-enzymer]

Forstyrrelser i lysosomalmembran-transport

Cystinose	cystintransport
Sialinlagrings- og Sallas sykdom	sialinsyretransport

V. Andre utførelsesformer

Oppfinnelsen beskrevet i det foreliggende er blitt delvis eksemplifisert ved hjelp av behandlingsmetoder hvor det anvendes celler som eksprimerer et spesielt genprodukt etter transfektering, dvs. etter innføring av en konstruksjon som koder for genproduktet og har regulerende elementer som regulerer ekspresjonen av kodingssekvensen. Disse metoder kan også utføres under anvendelse av celler som er blitt genetisk modifisert ved hjelp av andre metoder, innbefattende innsikting av gener og gen-aktivering (se Treco et al. (WO 95/31560; se også Selden et al. WO 93/09222).

hGH-signalpeptidet kan anvendes med andre heterologe proteiner enn α-gal A, under øking av nivået for ekspresjon og utsondring av det heterologe protein. Eksempler på slike proteiner innbefatter α-1-antitrypsin, antitrombin III, apolipoprotein E, apolipoprotein A-1, blodkoagulasjonsfaktorer V, VII, VIII, IX, X og XIII, benvekstfaktor-2, benvekstfaktor-7, kalsitonin, katalytiske antistoffer, DNAse, erytropoietin, FSH-β, globiner, glukagon, glykocerebrosidase, G-CSF, GM-CSF, veksthormon, immunrespons-modifiserende midler, immunglobuliner, insulin, insulintropin, insulinliknende vekstfaktorer, interferon-β, interferon-β-nervevekst-

faktorer, interleukin-1, interleukin-2, interleukin-3, interleukin-4, interleukin-6, interleukin-11, interleukin-12, IL-2-reseptor, IL-1-reseptor-antagonister, lavdensitets-lipoprotein-reseptor, M-CSF, paratyroid-hormon, proteinkinase C, løselig CD4, superoksid-dismutase, vevsplasminogen-aktivator, TGF-β, tumornekrosefaktor, TSHβ, tyrosinhydroksylase og urokinase.

SEKVENSLISTE

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT: Transkaryotic Therapies, Inc.

(ii) TITLE OF INVENTION: THERAPY FOR α-GALACTOSIDASE A DEFICIENCY

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 28

(iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: Fish & Richardson, P.C.
(B) STREET: 225 Franklin Street
(C) CITY: Boston
(D) STATE: MA
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 02110-2804

(v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:

(vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: 08/712,614
(B) FILING DATE: 13-SEP-1996
(C) CLASSIFICATION:

(viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Fraser, Janis K.
(B) REGISTRATION NUMBER: 34,819
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 07236/003W01

(ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: 617/542-5070
(B) TELEFAX: 617/542-8906
(C) TELEX: 200154

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

CTGGGCTGTA GCTATGATAA AC 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

TCTAGCTGAA GCAAAACAGT G 21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 19 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

ATTGGTCCGC CCCTGAGGT 19

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TGATGCAGGA ATCTGGCTCT 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

TTTTGGATCC ACCATGGCTA 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

TTTTGCCGGC ACTGCCCTCT TGAA 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 24 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

TTTTCAGCTG GACAATGGAT TGGC 24

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 20 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

TTTTGCTAGC TGGCGAATCC 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

TTTTGGATCC GTGTCCCATA GTGTTTCCAA 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 28 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

TTTTGGATCC GCAGTCGTGG CCAGTACC 28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

CTAGTCCTAG GA 12

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 22 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

TTTTGAGCAC AGAGCCTCGC CT 22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 30 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

TTTTGGATCC GGTGAGCTGC GAGAATAGCC 30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 76 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

GGGCCCCCAG CCCCAGCCCT CCCATTGGTG GAGGCCCTTT TGGAGGCACC CTAGGGCCAG 60

GAAACTTTTG CCGTAT 76

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 69 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

AAATAGGGCA GATCCGGGCT TTATTATTTT AGCACCACGG CCGCCGAGAC CGCGTCCGCC 60

CCGCGAGCA 69

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 86 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

TGCCCTATTT ATACGGCAAA AGTTTCCTGG CCCTAGGGTG CCTCCAAAAG GGCCTCCACC 60

AATGGGAGGG CTGGGGCTGG GGGCCC 86

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 55 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

CGCGGGGCGG ACGCGGTCTC GGCGGCCGTG GTGCTAAAAT AATAAAGCCC GGATC 55

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1343 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC 60
ATCTGGGCTG CGCGCTTGCG CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG 120
CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC 180
GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT 240
TCATCGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC 300
TCTGCATTGA TGACTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG 360
ACCCTCAGCG CTTTCCTCAT GGGATTCGCC AGCTAGCTAA TTATGTTCAC AGCAAAGGAC 420
TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT 480
TTGGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAAT 540
TTGATGGTTG TTACTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT 600
TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT 660
GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT 720
TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA 780
ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG 840
TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA 900
TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG 960
CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT 1020
ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT 1080
GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG 1140
TTGCTTCCCT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTCATCACA CAGCTCCTCC 1200
CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGACTTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC 1260
CCACAGGCAC TGTTTTGCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC 1320

TTTAAAAAAA AAAAAAACTC GAG 1343

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 210 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

CTGGGCTGTA GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGA CCTCGCTCTT ATACCATCGC 60

AGTTGCTTCC CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT 120

CCCTGTGAAA AGGAAGCTAG GGTTCTATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA 180

TCCCACAGGC ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA 210

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 268 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

ATTGGTCCGC CCCTGAGGTT AATCTTAAAA GCCCAGGTTA CCCGCGGAAA TTTATGCTGT 60

CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC ATCTGGGCTG CGCGCTTGCG 120

CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG CTAGAGCACT GGACAATGGA 180

TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC GCTTCATGTG CAACCTTGAC 240

TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCA 268

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 26 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: not relevant
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 78 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

ATGGCTACAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG 60

CTTCAAGAGG GCAGTGCC 78

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

TTTTGGATCC CTCGAGGACA TTGATTATTG ACTAG 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 28 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

TTTTGGATCC CGTGTCAAGG ACGGTGAC 28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 1197 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:25:

CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCACTGGGA GCGCTTCATG 60

TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTCATGGAG 120

ATGGCAGAGC TCATGGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT 180

GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAAGAGAT TCAGAAGGCA GACTTCAGGC AGACCCTCAG 240

CGCTTTCCTC ATGGGATTCG CCAGCTAGCT AATTATGTTC ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA 300

GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCGCAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC 360

TACGACATTG ATGCCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT 420

TGTTACTGTG ACAGTTTGGA AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTTGGCCCTG 480

```
AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTACTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT     540

CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGCTGAC     600

ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG     660

AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC     720

AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGGC TATCATGGCT     780

GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAGCCAA AGCTCTCCTT     840

CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT     900

AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA     960

GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGA CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC    1020

CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA    1080

AGGAAGCTAG GGTTCTATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC    1140

ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA       1197
```

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 398 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: not relevant
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:26:

```
Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
1               5                  10                  15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
            20                  25                  30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
        35                  40                  45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp
    50                  55                  60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln
65                  70                  75                  80

Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys
                85                  90                  95

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala
            100                 105                 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe
        115                 120                 125

Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp
    130                 135                 140
```

```
Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu
145                 150                 155                 160

Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr
                165                 170                 175

Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys
            180                 185                 190

Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile
        195                 200                 205

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp
    210                 215                 220

Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly
225                 230                 235                 240

Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp
                245                 250                 255

Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile
            260                 265                 270

Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile
        275                 280                 285

Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp
    290                 295                 300

Asn Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val
305                 310                 315                 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile
                325                 330                 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe
            340                 345                 350

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

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

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

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:27:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 338 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:27:

```
ATGGCTACAG GTAAGCGCCC CTAAAATCCC TTTGGGCACA ATGTGTCCTG AGGGGAGAGG      60

CAGCGACCTG TAGATGGGAC GGGGGCACTA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG     120
```

TATCGCCATG TAAGCCCAGT ATTTGGCCAA TCTCAGAAAG CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT 180

GGAGAGAGAA AAACAAACAG CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC 240

TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TTCTCCCCAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG 300

GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTTCAAGAGG GCAGTGCC 338

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:28:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 10 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(C) STRANDEDNESS: not relevant
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:28:

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr
1 5 10

PATENTKRAV

1. DNA-molekyl, karakterisert ved at det omfatter en første sekvens som koder for human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR: 21; og, knyttet til 3' end av den første sekvensen, en andre sekvens kodende for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A.

2. DNA-molekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at DNA-molekylet omfatter et intron i sekvensen som koder for signalpeptidet.

3. DNA-molekyl ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at DNA-molekylet omfatter en utranslatert sekvens på minst 6 nukleotider beliggende rett 3' for termineringskodonet til den andre sekvensen, idet nevnte utranslaterte sekvens omfatter et polyadenyleringssete.

4. DNA-molekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at den andre sekvensen koder for et polypeptid omfattende SEKV ID NR:26.

5. DNA-molekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at den andre sekvensen koder for et polypeptid omfattende aminosyrene 1 til 370 ifølge SEKV ID NR:26.

6. Ekspresjonskonstruksjon, karakterisert ved at den omfatter DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og er egnet for ekspresjon i en human celle.

7. Dyrket human celle, karakterisert ved at den omfatter
   (i) ekspresjonskonstruksjoner ifølge krav 6, eller
   (ii) DNA-molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR:21 og (b) muliggjør ekspresjon av polypeptidet i cellen.

8. Celle ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte celle er en fibroblast.

9. Celle ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte celler er valgt fra gruppen bestående av en epitelcelle, en endotelcelle, en benmargscelle, en gliacelle, en hepatocytt, en keratinocytt, en myocitt, et neuron eller en forløper av disse celletypene.

10. Dyrket human celle eller en kloncellelinje eller stamme som definert i et hvilket som helst av kravene 7 til 9 eller 11 til 14, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er for anvendelse i terapi.

11. Kloncellestamme, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den

(i) består hovedsakelig av mange dyrkede humane celler transfektert med et DNA-molekyl ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptide omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR: 21, og (b) muliggjør overekspresjon av polypeptidet i cellene; eller

(ii) av de dyrkede cellene som definert i hvilke som helst av kravene 7 til 9.

12. Kloncellestamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte celler er fibroblaster.

13. Kloncellelinje, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den

(i) består hovedsaklig av mange udødliggjorte humane celler transfektert med DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 som (a) koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A koblet til human veksthormon (hGH) signalpeptid SEKV ID NR: 21 og (b) muliggjør overekspresjon av polypeptidet i cellene; eller

(ii) av de dyrkede cellene som definert i hvilke som helst av kravene 7 til 9.

14. Kloncellelinje ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte celle er valgt fra gruppen bestående av en Bowes-melanomcelle, en Daudi-celle, en HeLa-celle, en HL-60-celle, en HT1080-celle, en Jurkat-celle, en KB-karcinom-celle, en K-562-leukemicelle, en MCF-7 brystkreftcelle, en MOLT-4-celle, en Namalwa-celle, en Raji-celle, en RPMI 8226-celle, en U-937-celle, en WI-38VA13-(sublinje 2R4)-celle og en 2780AD-ovarie-karcinomcelle.

15. Protein, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det blir kodet av DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5.

16. Fremgangsmåte for fremstilling av glykosylert human alfa-galaktosidase A, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter

(i) dyrking av cellen ifølge krav 8 under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra DNA-molekylet og sekresjon av glykosylert human alfa-galaktosidase A i dyrkningsmediet til cellen; og
isolering av glykosylert human alfa-galaktosidase A fra dyrkningsmediet;

(ii) dyrking av cellen ifølge krav 10 under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra nevnte DNA-molekyl og sekresjon av glykosylert human alfa-galaktosidase A inn i kulturmediet til cellen; og
isolering av glykosylert human alfa-galaktosidase A fra dyrkningsmediet; eller

(iii) dyrking av en human celle inneholdende DNA-molekyl ifølge krav 1 som koder for et polypeptid omfattende human alfa-galaktosidase A under betingelser som muliggjør ekspresjon av human alfa-galaktosidase A fra nevnte DNA-molekyl.

17. Fremgangsmåte for fremstilling av human alfa-galaktosidase A,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter

(a) tilveiebringing av en transfekt human celle genetisk modifisert å omfatte DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og å uttrykke human alfa-galaktosidase A, og

(b) oppnå human alfa-galaktosidase A fra nevnte celler.

18. Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t cellen er en fibroblaster.

19. Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t cellen er en primærcelle.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t cellen er en sekundærcelle.

21. Anvendelse av en human celle genetisk modifisert *ex vivo* til å omfatte DNA-molekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5 og å overuttrykke og utskille human alfa-galaktosidase A for fremstilling av et medikament for behandling av en pasient antatt å ha en a-galaktosidase A mangel vesentlig som beskrevet i beskrivelsen.

CTGGGCTGTAGCTATGATAAACCGGCAGGA
GATTGGTGGACCTCGCTCTTATACCATCGCA
GTTGCTTCCCTGGGTAAAGGAGTGGCCTGTA
ATCCTGCCTGCTTCATCACACAGCTCCTCCCT
GTGAAAAGGAAGCTAGGGTTCTATGAATGGA
CTTCAAGGTTAAGAAGTCACATAAATCCCAC
AGGCACTGTTTTGCTTCAGCTAGA

FIG. 1

ATTGGTCCGCCCCTGAGGTTAATCTTAAAAG

SacII

CCCAGGTTACCCGCGGAAATTTATGCTGTC

CGGTCACCGTGACAATGCAGCTGAGGAACC

CAGAACTACATCTGGGCTGCGCGCTTGCGCT

TCGCTTCCTGGCCCTCGTTTCCTGGGACATC

CCTGGGGCTAGAGCACTGGACAATGGATTG

NcoI

GCAAGGACGCCTACCATGGCTGGCTGCAC

TGGGAGCGCTTCATGTGCAACCTTGACTGCC

AGGAAGAGCCAGATTCCTGCATCA

FIG. 2

```
   1 CCGCGGGAAA TTTATGCTGT CCGGTCACCG TGACAATGCA GCTGAGGAAC CCAGAACTAC
  61 ATCTGGGCTG CGCGCTTGCG CTTCGCTTCC TGGCCCTCGT TTCCTGGGAC ATCCCTGGGG
 121 CTAGAGCACT GGACAATGGA TTGGCAAGGA CGCCTACCAT GGGCTGGCTG CACTGGGAGC
 181 GCTTCATGTG CAACCTTGAC TGCCAGGAAG AGCCAGATTC CTGCATCAGT GAGAAGCTCT
 241 TCATGGAGAT GGCAGAGCTC ATGGTCTCAG AAGGCTGGAA GGATGCAGGT TATGAGTACC
 301 TCTGCATTGA TGACTGTTGG ATGGCTCCCC AAAGAGATTC AGAAGGCAGA CTTCAGGCAG
 361 ACCCTCAGCG CTTTCCTCAT GGGATTCGCC AGCTAGCTAA TTATGTTCAC AGCAAAGGAC
 421 TGAAGCTAGG GATTTATGCA GATGTTGGAA ATAAAACCTG CGCAGGCTTC CCTGGGAGTT
 481 TTGGATACTA CGACATTGAT GCCCAGACCT TTGCTGACTG GGGAGTAGAT CTGCTAAAAT
 541 TTGATGGTTG TTACTGTGAC AGTTTGGAAA ATTTGGCAGA TGGTTATAAG CACATGTCCT
 601 TGGCCCTGAA TAGGACTGGC AGAAGCATTG TGTACTCCTG TGAGTGGCCT CTTTATATGT
 661 GGCCCTTTCA AAAGCCCAAT TATACAGAAA TCCGACAGTA CTGCAATCAC TGGCGAAATT
 721 TTGCTGACAT TGATGATTCC TGGAAAAGTA TAAAGAGTAT CTTGGACTGG ACATCTTTTA
 781 ACCAGGAGAG AATTGTTGAT GTTGCTGGAC CAGGGGGTTG GAATGACCCA GATATGTTAG
 841 TGATTGGCAA CTTTGGCCTC AGCTGGAATC AGCAAGTAAC TCAGATGGCC CTCTGGGCTA
 901 TCATGGCTGC TCCTTTATTC ATGTCTAATG ACCTCCGACA CATCAGCCCT CAAGCCAAAG
 961 CTCTCCTTCA GGATAAGGAC GTAATTGCCA TCAATCAGGA CCCCTTGGGC AAGCAAGGGT
1021 ACCAGCTTAG ACAGGGAGAC AACTTTGAAG TGTGGGAACG ACCTCTCTCA GGCTTAGCCT
1081 GGGCTGTAGC TATGATAAAC CGGCAGGAGA TTGGTGGACC TCGCTCTTAT ACCATCGCAG
1141 TTGCTTCCCT GGGTAAAGGA GTGGCCTGTA ATCCTGCCTG CTTCATCACA CAGCTCCTCC
1201 CTGTGAAAAG GAAGCTAGGG TTCTATGAAT GGACTTCAAG GTTAAGAAGT CACATAAATC
1261 CCACAGGCAC TGTTTTGCTT CAGCTAGAAA ATACAATGCA GATGTCATTA AAAGACTTAC
1321 TTTAAAAAAA AAAAAAACTC GAG
```

FIG. 3

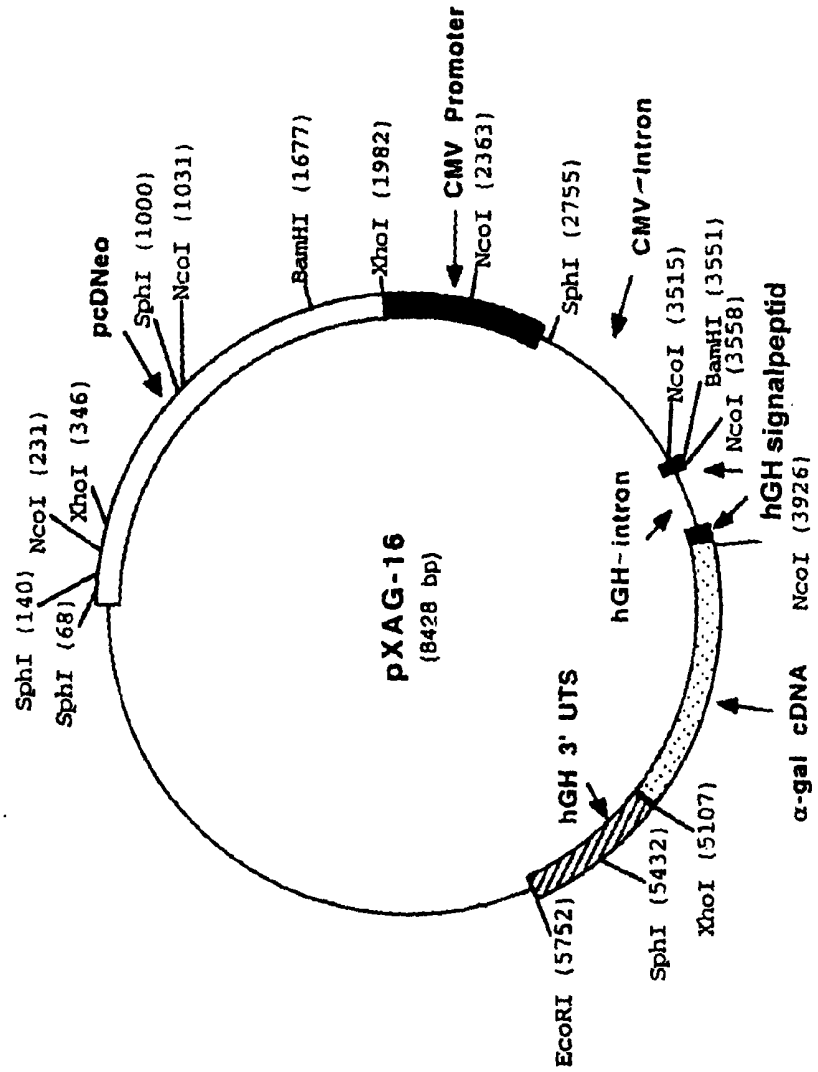

pXAG-16
(8428 bp)
pcDNeo
CMV Promoter
CMV-intron
hGH-intron
hGH signalpeptid
α-gal cDNA
hGH 3' UTS
SphI (140)
NcoI (231)
SphI (68)
XhoI (346)
SphI (1000)
NcoI (1031)
BamHI (1677)
XhoI (1982)
NcoI (2363)
SphI (2755)
NcoI (3515)
BamHI (3551)
NcoI (3558)
NcoI (3926)
XhoI (5107)
SphI (5432)
EcoRI (5752)

FIG. 4

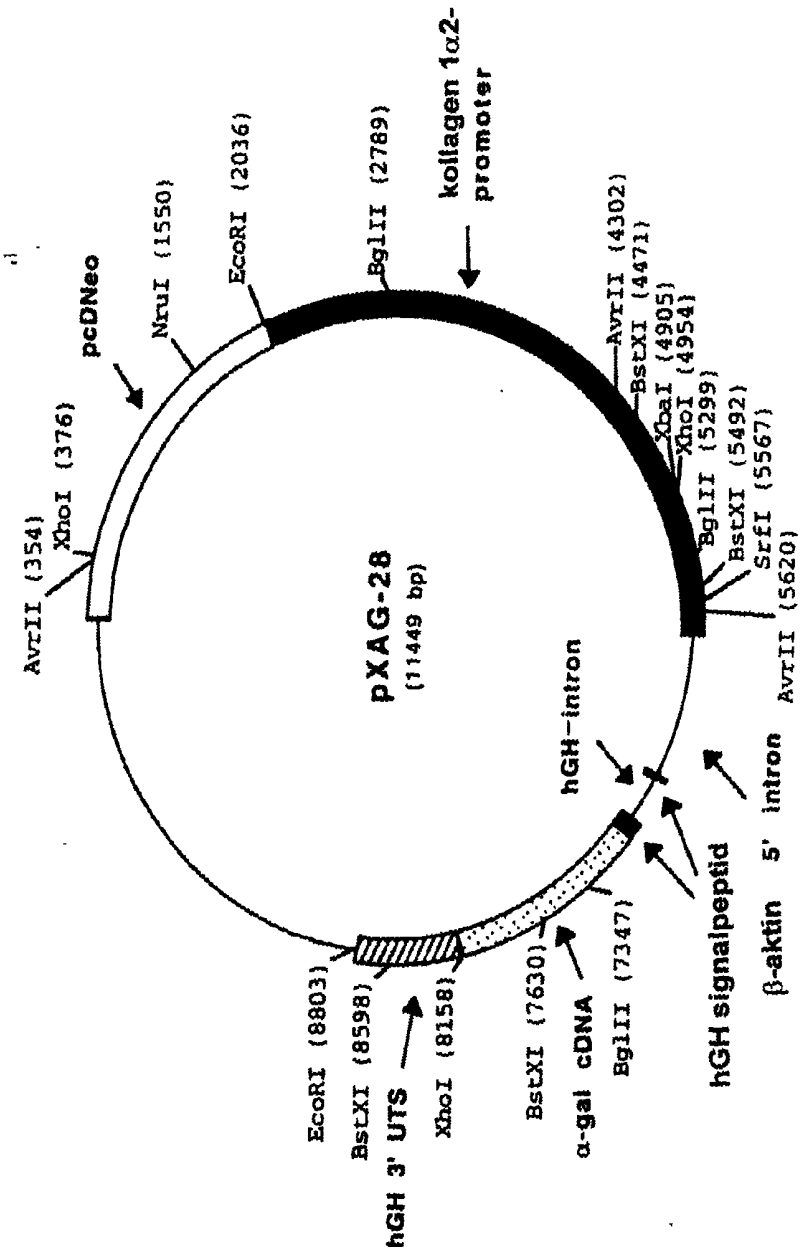

pXAG-28
(11449 bp)
kollagen 1α2-promoter
BglII (2789)
EcoRI (2036)
NruI (1550)
pcDNeo
XhoI (376)
AvrII (354)
AvrII (4302)
BstXI (4471)
XbaI (4905)
XhoI (4954)
BglII (5299)
BstXI (5492)
SrfI (5567)
AvrII (5620)
β-aktin 5' intron
hGH signalpeptid
hGH-intron
BglII (7347)
α-gal cDNA
BstXI (7630)
XhoI (8158)
hGH 3' UTS
BstXI (8598)
EcoRI (8803)

FIG. 5

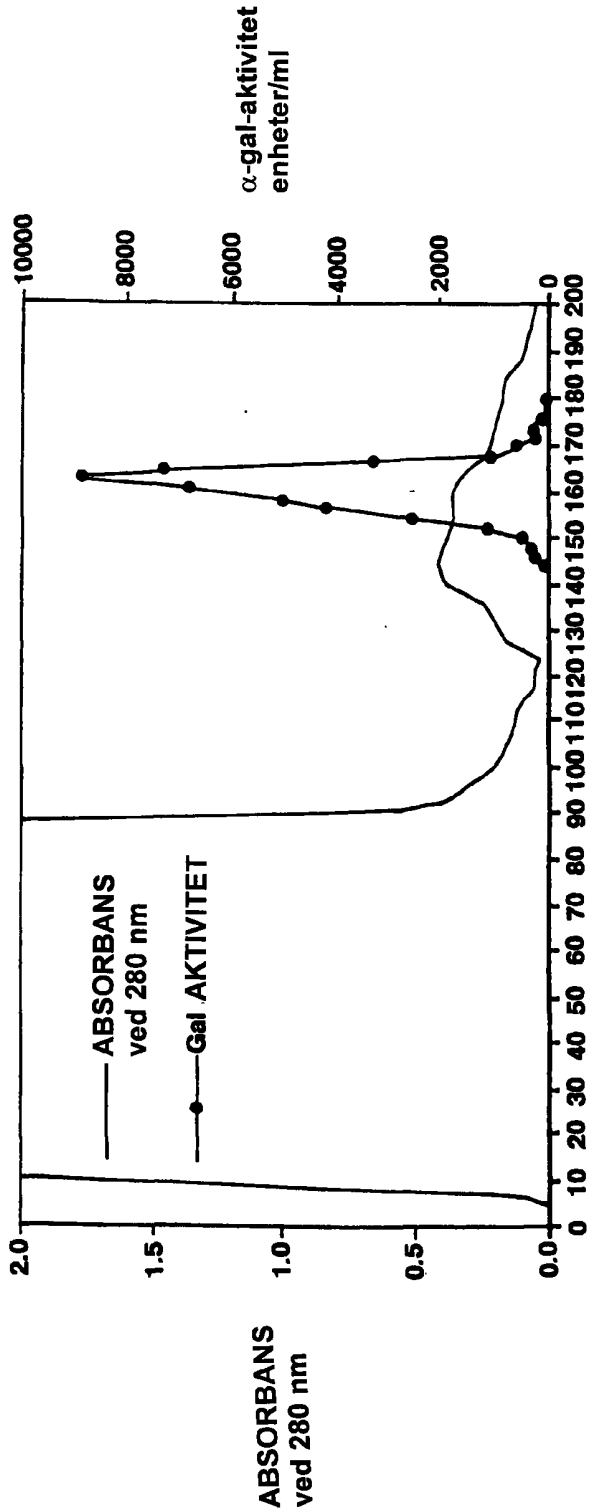

α-gal-aktivitet
enheter/ml
10000
8000
6000
4000
2000
0
ABSORBANS
ved 280 nm
Gal AKTIVITET
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ABSORBANS
ved 280 nm
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
FRAKSJON NUMMER

FIG. 6

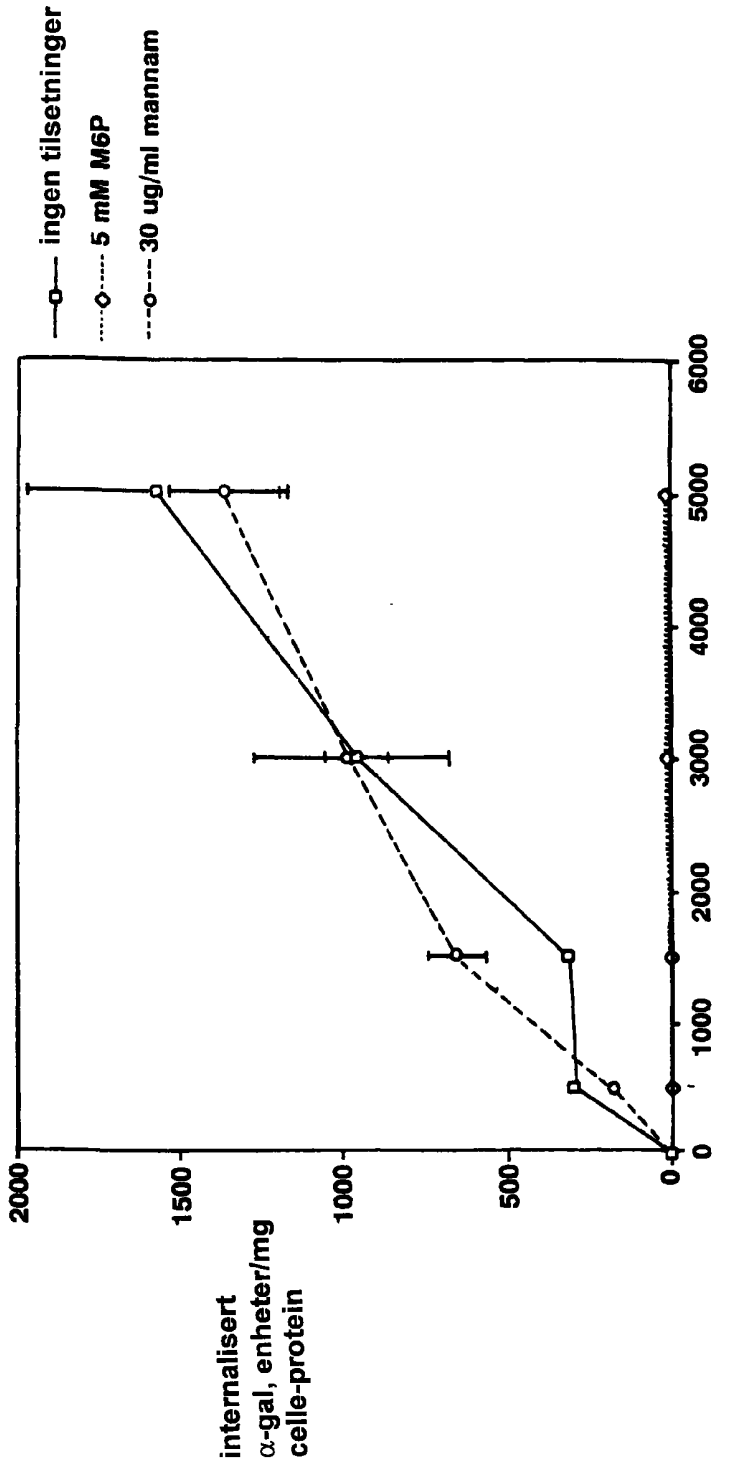

ingen tilsetninger
5 mM M6P
30 ug/ml mannam
internalisert α-gal, enheter/mg celle-protein
2000
1500
1000
500
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
α-gal, enheter/ml

FIG. 7

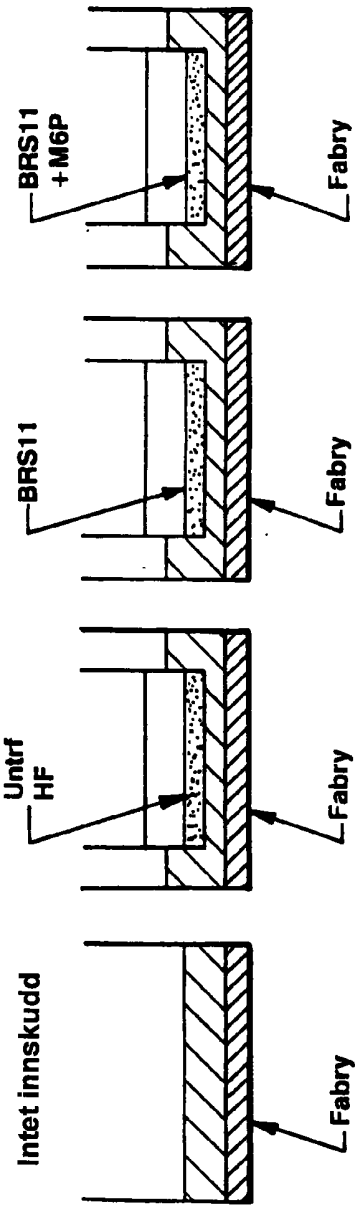

Intet innskudd
Fabry
Untrf
HF
Fabry
BRS11
Fabry
BRS11
+M6P
Fabry

FIG. 8

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

FIG. 9

ATGGCTACAG GTAAGCGCCC CTAAAATCCC TTTGGGCACA

ATGTGTCCTG AGGGGAGAGG CAGCGACCTG TAGATGGGAC

GGGGGCACTA ACCCTCAGGT TTGGGGCTTC TGAATGTGAG

TATCGCCATG TAAGCCCAGT ATTTGGCCAA TCTCAGAAAG

CTCCTGGTCC CTGGAGGGAT GGAGAGAGAA AAACAAACAG

CTCCTGGAGC AGGGAGAGTG CTGGCCTCTT GCTCTCCGGC

TCCCTCTGTT GCCCTCTGGT TTCTCCCCAG GCTCCCGGAC

GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG

CTTCAAGAGG GCAGTGCC

FIG. 10

ATGGCTACAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG

GCCTGCTCTG CCTGCCCTGG CTTCAAGAGG GCAGTGCC

FIG. 11

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala
Phe Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly
Ser Ala

FIG. 12

```
   1 CTGGACAATG GATTGGCAAG GACGCCTACC ATGGGCTGGC TGCACTGGGA GCGCTTCATG
  61 TGCAACCTTG ACTGCCAGGA AGAGCCAGAT TCCTGCATCA GTGAGAAGCT CTTCATGGAG
 121 ATGGCAGAGC TCATGGTCTC AGAAGGCTGG AAGGATGCAG GTTATGAGTA CCTCTGCATT
 181 GATGACTGTT GGATGGCTCC CCAAAGAGAT TCAGAAGGCA GACTTCAGGC AGACCCTCAG
 241 CGCTTTCCTC ATGGGATTCG CCAGCTAGCT AATTATGTTC ACAGCAAAGG ACTGAAGCTA
 301 GGGATTTATG CAGATGTTGG AAATAAAACC TGCGCAGGCT TCCCTGGGAG TTTTGGATAC
 361 TACGACATTG ATGCCCAGAC CTTTGCTGAC TGGGGAGTAG ATCTGCTAAA ATTTGATGGT
 421 TGTTACTGTG ACAGTTTGGA AAATTTGGCA GATGGTTATA AGCACATGTC CTTGGCCCTG
 481 AATAGGACTG GCAGAAGCAT TGTGTACTCC TGTGAGTGGC CTCTTTATAT GTGGCCCTTT
 541 CAAAAGCCCA ATTATACAGA AATCCGACAG TACTGCAATC ACTGGCGAAA TTTTGCTGAC
 601 ATTGATGATT CCTGGAAAAG TATAAAGAGT ATCTTGGACT GGACATCTTT TAACCAGGAG
 661 AGAATTGTTG ATGTTGCTGG ACCAGGGGGT TGGAATGACC CAGATATGTT AGTGATTGGC
 721 AACTTTGGCC TCAGCTGGAA TCAGCAAGTA ACTCAGATGG CCCTCTGGGC TATCATGGCT
 781 GCTCCTTTAT TCATGTCTAA TGACCTCCGA CACATCAGCC CTCAAGCCAA AGCTCTCCTT
 841 CAGGATAAGG ACGTAATTGC CATCAATCAG GACCCCTTGG GCAAGCAAGG GTACCAGCTT
 901 AGACAGGGAG ACAACTTTGA AGTGTGGGAA CGACCTCTCT CAGGCTTAGC CTGGGCTGTA
 961 GCTATGATAA ACCGGCAGGA GATTGGTGGA CCTCGCTCTT ATACCATCGC AGTTGCTTCC
1021 CTGGGTAAAG GAGTGGCCTG TAATCCTGCC TGCTTCATCA CACAGCTCCT CCCTGTGAAA
1081 AGGAAGCTAG GGTTCTATGA ATGGACTTCA AGGTTAAGAA GTCACATAAA TCCCACAGGC
1141 ACTGTTTTGC TTCAGCTAGA AAATACAATG CAGATGTCAT TAAAAGACTT ACTTTAA
```

FIG. 13