



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2121713 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07H 15/04 (2006.01)
A61K 31/738 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.09.23
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.06.12
(86)	Europeisk søknadsnr	08727910.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.01.18
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.11.25
(30)	Prioritet	2007.01.18, US, 885471 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Genzyme Corporation, 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142, USA
(72)	Oppfinner	ZHU, Yunxiang, 10 Caulfield Road, Wayland, MA 01778, USA CHENG, Seng, H., 50 Wall Street, Wellesley, MA 02481, USA JIANG, Canwen, 14 Heather Lane, Southborough, MA 01772, USA AVILA, Luis, Z., 11 Sleepy Hollow Lane, Arlington, MA 02474, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Oligosakkarider omfattende en aminosygruppe og konjugater derav
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2002 137 125 US-A1- 2005 048 047 US-A1- 2005 169 941 ANDREW LEES ET AL: "Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminooxy reagents and oxime chemistry" VACCINE, vol. 24, 2006, pages 716-729, XP005281363 ELENA C. RODRIGUEZ ET AL: "Aminooxy-, Hydrazide-, and Thiosemicarbazide-Functionalized Saccharides: Versatile Reagents for Glycoconjugate Synthesis" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 63, 1998, pages 7134-7135, XP002484548

OLIGOSAKKARIDER OMFATTENDE EN AMINOOKSYGRUPPE OG KONJUGATER DERAU

5 Beskrivelsen vedrører generelt fremgangsmåter for syntese av oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe fra oligosakkarider omfattende en reaktiv gruppe. I en annen utførelsesform vedrører oppfinnelsen videre oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe.

10 Beskrivelsen vedrører også fremgangsmåter for konjugering av oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe til proteiner, innbefattende glykoproteiner (så som for eksempel lysomale enzymer), og sammensetninger av oligosakkarid-proteinkonjugater, innbefattende oligosakkarid-glykoproteinkonjugater. En annen utførelsesform av oppfinnelsen vedrører fremgangsmåter for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelse ved anvendelse av slike oligosakkarid-lysosomalt enzym konjugater.

15 Lysosomale lagringslidelser (LSD'er) er en klasse av sjeldne metaboliske lidelser som omfatter over førti genetiske lidelser som involverer en mangel i aktiviteten av lysosomale hydrolaser. Et kjernetrekk ved LSD'er er den anormale akkumuleringen av lysosomale metabolitter, som fører til dannelsen av store antall utspente lysosymer.

20 LSD'er kan behandles ved administrering av den aktive versjonen av enzymet som pasienten mangler, en prosess som betegnes enzymerstatningsterapi (ERT). Det administrerte erstatningsenzymet som bærer et terminalt mannose-6-fosfat (M6P) tas opp ved målceller gjennom celleoverflateassosiert kation-uavhengig M6P reseptor (CI-MPR)-formidlet endocytose, og rettes mot lysosomet.

25 Generelt bli dårlig fosforylerte erstatningsenzymer ikke internalisert av M6P reseptoren på celleoverflater, og kan derfor ikke rettes mot lysosomet hvor de fungerer. Følgelig kan en lav grad av mannosefosforylering ha en signifikant og negativ effekt på den terapeutiske virkningsfullheten av et erstatningsenzym.

30 Fremgangsmåter har følgelig blitt utviklet for å øke M6P innholdet av erstatningsenzymer. U.S. patent nr. 7,001,994 beskriver for eksempel en fremgangsmåte for kopling av oligosakkarider omfattende M6P med glykoproteiner. Oligosakkaridene av glykoproteinene blir først oksidert med periodat eller galaktoseoksidase for å resultere i dannelsen av karbonylgrupper,

som deretter kjemisk konjugeres med et oligosakkarid funksjonalisert ved den reduserende enden med en karbonylreaktiv gruppe (så som for eksempel en hydrazin-, hydrazid-, aminooksy-, tiosemikarbazid-, semikarbazid- eller amingruppe) for å gi et oligosakkarid-glykoprotein konjugat.

5

Et konjugat av det lysosomale enzymet sur α -glukosidase (GAA) med et bis-M6P oligosakkarid ble fremstilt ved den ovenfor omtalte fremgangsmåten, og ble funnet å være mer effektivt i å redusere skjelett- og hjertemuskelglykogen enn rekombinant humant GAA i en musemodell av Pompe-sykdom, en autosomal recessiv muskulær sykdom som skyldes en metabolisk mangel på GAA, og er kjennetegnet ved akkumuleringen av lysosomalt glykogen.

10

US 20050169941 beskriver et konjugat omfattende en amino-oksy homofunksjonell reagens og en enhet valgt fra polysakkarider, oligosakkarider, karbohydrater, og karbohydratholdige molekyler inneholdende minst en karbonylgruppe for å danne et polysakkarid, oligosakkarid, karbohydrat eller karbohydratholdig molekyl funksjonalisert via minst ett oksim-bindeledd. US 20020137125 beskriver høyt fosforylerte mannopyranosyl oligosakkaridderivater inneholdende mannose-6-fosfat (M6P), eller andre oligosakkarider som bærer andre terminale heksoser. US20050048047 vedrører den intratekale (IT) administreringen av rekombinant enzym for å behandle lysosomale lagringsforstyrrelser.

15

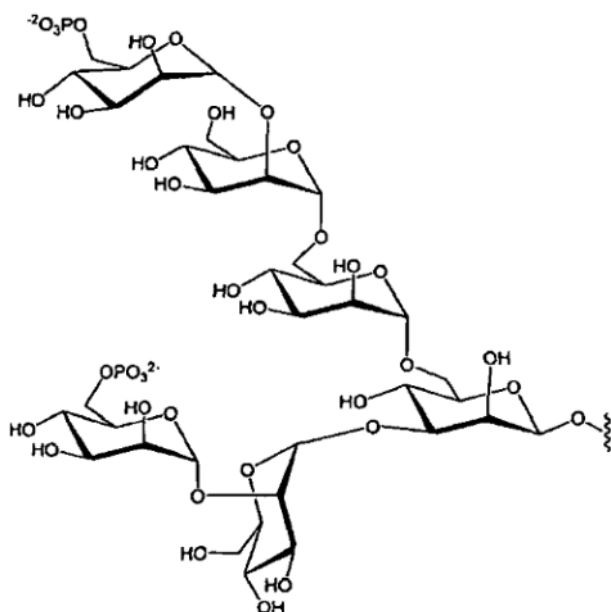
20

Aminooksygrupper er spesielt nyttige karbonylreaktive grupper for konjugeringsreaksjonene beskrevet ovenfor, ettersom de resulterende konjugatene omfatter et relativt stabilt oksim-bindeledd. Det foreligger derfor et behov for fremgangsmåter for fremstillingen av aminooksyfunksjonaliserte oligosakkarider.

25

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et oligosakkarid-lysosomalt enzym konjugat, omfattende (1) et lysosomalt enzym, (2) et oligosakkarid, og (3) en oksimgruppe som forbinder det lysosomale enzymet og oligosakkaridet, hvori oligosakkaridet er et oligosakkarid av formel VI:

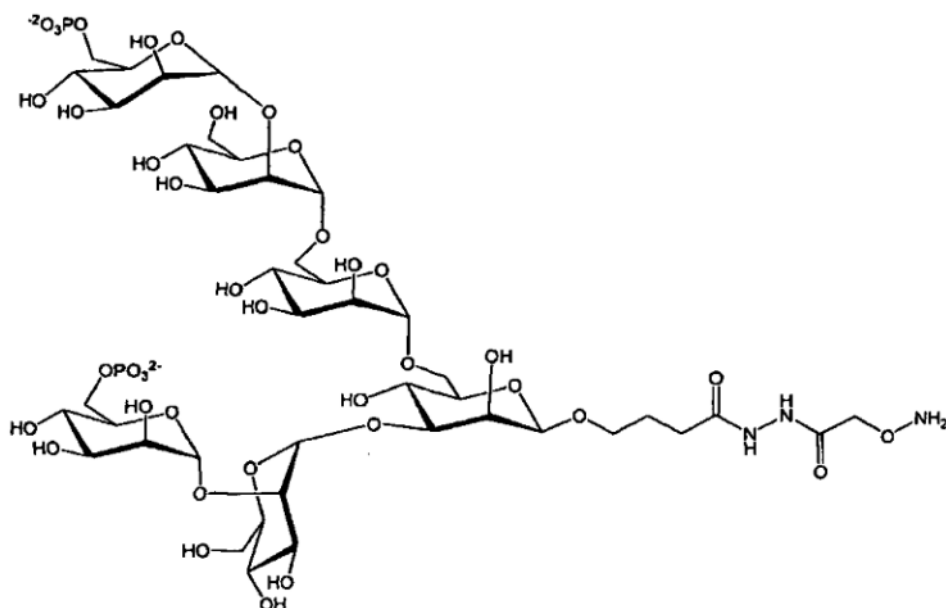
30

Formel **VI**

Oppfinnelsen tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av konjugatet ved kopling av et oligosakkarid til et lysosomalt enzym, omfattende:

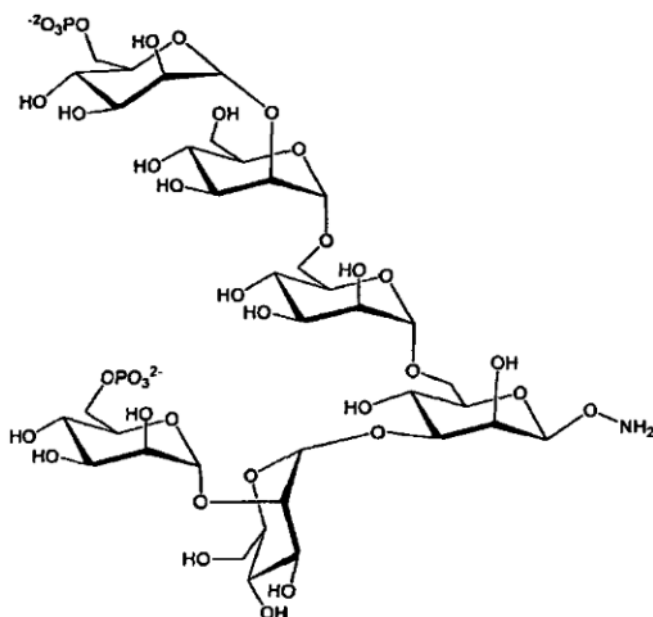
- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe;
- (b) tilveiebringelse av et lysosomalt enzym som har en karbonylgruppe, og
- (c) omsetning av aminoksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av det lysosomale enzymet,

for derved å kople oligosakkaridet til det lysosomale enzymet, hvori oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe er



Oppfinnelsen tilveiebringer videre en fremgangsmåte for fremstilling av konjugatet ved kopling av et oligosakkarid til et lysosomalt enzym, omfattende:

- 5 (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe;
- (b) tilveiebringelse av et lysosomalt enzym som har minst en karbonylgruppe; og
- (c) omsetning av aminoksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av det lysosomale enzymet,
- 10 for derved å kople oligosakkaridet til det lysosomale enzymet, hvori oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe er



Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgende fremgangsmåter for fremstilling av oligosakkarider omfattende en aminoksygruppe. Disse fremgangsmåtene er generelt anvendelige for en lang rekke av beskyttede eller ubeskyttede oligosakkarider, så som for eksempel forgrenede og uforgrenede, og forforylerte og ufosforylerte oligosakkarider. I visse utførelsesformer kan oligosakkaridene være et disakkarid, trisakkarid, tetrasakkarid, pentasakkarid, heksasakkarid, heptasakkarid, eller høyere. Oligosakkaridet kan, i visse utførelsesformer, omfatte minst en M6P rest. I visse utførelsesformer kan oligosakkaridet omfatte minst 1, 2, 3, 4, 5, 6 eller 7 terminale M6P rester.

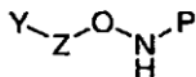
Oppfinnelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe fra et oligosakkarid omfattende en reaktiv gruppe. Fremgangsmåten omfatter:

- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en første reaktiv gruppe;
- (b) tilveiebringelse av en aminoksygruppe omfattende en aminoksygruppe og en andre reaktiv gruppe; og
- (c) omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridet med den andre reaktive gruppen av aminoksyforbindelsen, for derved å fremstille oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe.

De første og andre reaktive gruppene kan være valgt fra, f.eks. hydrazin-, hydrazid-, tiosemikarbazid-, semikarbazid-, amin-, karboksyl-, aktivert ester-,

acylhalid-, acylazid-, alkylhalid-, anhydrid-, isotiocyanat-, isocyanat-, og sulfonylhalidgrupper.

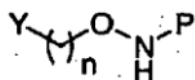
I noen utførelsesformer er aminooksyforbindelsen valgt fra forbindelser av formel II:



Formel **II**

hvor Y er den andre reaktive gruppen, Z er valgt fra alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, og heterocyklyl, og P er valgt fra aminobeskyttende grupper (så som f.eks. karbamatbeskyttende grupper). I noen utførelsesformer kan f.eks. Y være en karboksyl, aktivert ester, acylhalid (så som f.eks. et acylfluorid eller acylklorid), acylazid, alkylhalid, anhydrid, isotiocyanat, isocyanat, eller sulfonylhalid (så som f.eks. et sulfonylklorid eller sulfonylbromid). I andre utførelsesformer kan Y være f.eks. en hydrazin-, hydrazid-, tiosemikarbazid-, semikarbazid-, eller amingruppe.

I visse utførelsesformer er aminooksyforbindelsen av formel II valgt fra forbindelser av formel **III**:

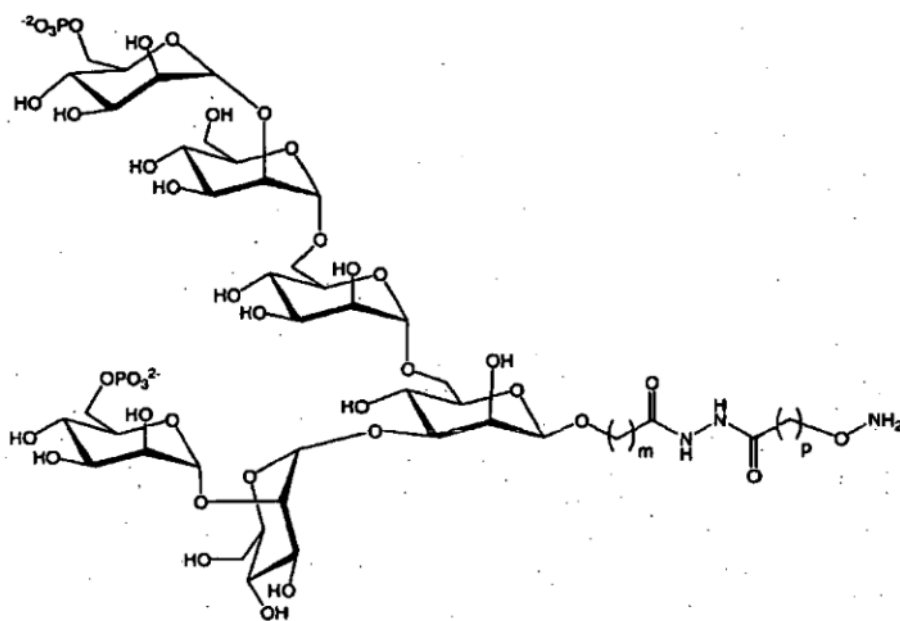


Formel **III**

hvor Y er den andre reaktive gruppen, n er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10, og P er valgt fra aminobeskyttende grupper.

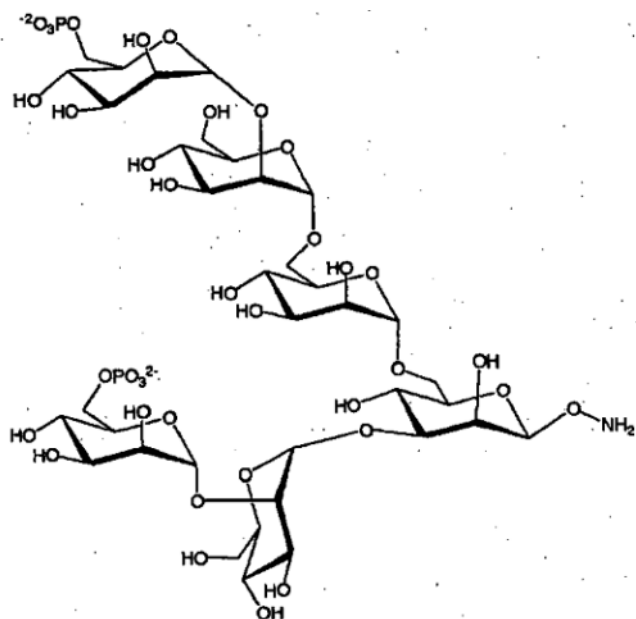
I visse utførelsesformer omfatter aminooksyforbindelsen en aminobeskyttende gruppe, og fremgangsmåten omfatter videre et trinn (d), avbeskyttelse av oligosakkaridet omfattende en aminooksygruppe.

Oppfinnelsen tilveiebringer videre et oligosakkarid omfattende (1) en aminooksygruppe og (2) mannose-6-fosfat. I noen utførelsesformer er oligosakkaridet fremstilt ved fremgangsmåtene beskrevet ovenfor. I noen utførelsesformer omfatter oppfinnelsen for eksempel et oligosakkarid omfattende en aminooksygruppe av formel **IV**:

Formel **IV**

5 hvori m og p uavhengig er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen et oligosakkarid av formel V:



Formel V

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for kopling av et oligosakkarid til et protein. I en utførelsesform omfatter fremgangsmåten:

- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe;
 - (b) tilveiebringelse av et protein som har minst en karbonylgruppe; og
 - (c) omsetning av aminoksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av proteinet,
- for derved å kople oligosakkaridet til proteinet.

I andre utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen videre et oligosakkarid-proteinkonjugat omfattende (1) et protein, (2) et oligosakkarid og (3) en oksimgruppe som forbinder proteinet og oligosakkaridet. I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen for eksempel et oligosakkarid-protein konjugat fremstilt ved fremgangsmåtene beskrevet ovenfor. I visse utførelsesformer er oligosakkarid-proteinkonjugatet et oligosakkarid-glykoproteinkonjugat. I visse utførelsesformer er oligosakkarid-glykoproteinkonjugatet konjugatet av et oligosakkarid omfattende minst en M6P og av et lysosomalt enzym, så som for eksempel en lysosomal hydrolase. I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen farmasøytiske sammensetninger omfattende et oligosakkarid-proteinkonjugat ifølge oppfinnelsen.

En annen utførelsesform av oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse, så som de som er beskrevet i tabell 1. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene administrering til et pattedyr av et oligosakkarid-glykoproteinkonjugat ifølge oppfinnelsen, hvori oligosakkaridet omfatter minst en M6P og glykoproteinet er en lysosomal hydrolase. Oppfinnelsen tilveiebringer videre et konjugat ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling av en lysosomal lagringslidelse i et objekt som har behov for dette, og i fremstillingen av et medikament for behandling av en lysosomal lagringslidelse.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 er et reaksjonsskjema som viser en illustrerende utførelsesform av fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Oligosakkarid **1**, som har en første reaktiv gruppe (en hydrazidgruppe), omsettes med aminooksyforbindelse **2** i nærvær av katalysatoren 3-hydroksy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on (DHBt-OH), for å gi oligosakkarid **3**. Tert-butyloksykarbonyl (t-Boc) aminobeskyttelsesgruppen av oligosakkarid **3** fjernes deretter med 50% trifluoreddiksyre /diklormetan (TFA/DCM) for å gi oligosakkarid **4**.

Figur 2 viser en serie av gelkromatografier av mellomprodukter i synteseskjemaet beskrevet i Figur **1**. **Figur 2A** er et Dionex analytisk kromatogram av utgangsoligosakkarid **1**. **Figur 2B** er et Dionex analytisk kromatogram av oligosakkarid **3**. **Figur 2C** er et Dionex analytisk kromatogram av oligosakkarid **4**.

Figur 3A er et massespektrum av oligosakkarid **1** (beregnet molekylvekt = 1250; beregnet molekylvekt av natriumsalt =1338). **Figur 3B** er et massespektrum av oligosakkarid **4** (beregnet molekylvekt =1323; beregnet molekylvekt av natriumsalt =1411).

Figur 4 er et reaksjonsskjema som viser en illustrerende utførelsesform av fremgangsmåtene av beskrivelseskonvensjonen. Oligosakkarid **5** som har en første reaktiv gruppe (en karboksylgruppe) omsettes med aminooksyforbindelse **6** i nærvær av koplingsmidlet 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid (EDC) og katalysatoren N-hydroksysuksinimid (NHS), for å gi aminooksyholdig oligosakkarid **3**. Boc aminobeskyttelsesgruppen av oligosakkarid **3** fjernes deretter med 50% TFA/DCM for å gi oligosakkarid **4**.

I. Fremstilling av et oligosakkarid omfattende en aminooksygruppe

A. Oligosakkarid omfattende en reaktiv gruppe

Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen er anvendelige på et bredt område av oligosakkarider omfattende en reaktiv gruppe. Som anvendt heri refererer et oligosakkarid til et disakkarid, trisakkarid, tetrasakkarid, pentasakkarid, heksasakkarid, heptasakkarid, eller større oligosakkarid (så som, f.eks. et oligosakkarid omfattende 2-50, 2-10, 8-25, eller 8-50 sakkaridenheter). I forskjellige utførelsesformer kan et oligosakkarid følgelig være f.eks. et

disakkarid, trisakkarid, tetrasakkarid, et pentasakkarid, et heksasakkarid, et heptasakkarid, eller et større oligosakkarid. Et oligosakkarid kan være mono-, bi-, tri-, tetra-, eller penta-antennært i struktur. Et oligosakkarid kan omfatte, 0, 1, 2, 3, 4, eller flere forgreningspunkter.

5

Den reaktive gruppen på oligosakkaridet, også betegnet som en første reaktiv gruppe, kan i noen utførelsesformer være for eksempel en hydrazingruppe, hydrazidgruppe, semikarbazidgruppe, tiosemikarbazid-, eller amingruppe. I noen utførelsesformer kan den første reaktive gruppen være for eksempel en

10 karboksylgruppe, ester (så som, for eksempel en aktivert ester), acylhalid (så som, f.eks. acylfluorid eller acylklorid), acylazid, alkylhalid, anhydrid, isotiocyanat, isocyanat, eller sulfonylhalid (så som, f.eks. sulfonylklorid eller sulfonylbromid) gruppe.

15

Den første reaktive gruppen kan være forbundet til den reduserende enden av oligosakkaridet eller være lokalisert hvor som helst i oligosakkaridet. Den første reaktive gruppen kan, i visse utførelsesformer, være forbundet gjennom et eller flere bindeledd til oligosakkaridet. Et bindeledd, som anvendt heri, kan velges fra, for eksempel en kombinasjon av eventuelt substituerte alkyl-, alkenyl-,

20 alkynyl-, aryl, heteroaryl-, heterocyklyl-, acyloksy-, alkoksy-, aryloksy-, og heterocyklyloksygrupper. Et bindeledd kan være avbrutt eller terminert ved ett eller flere heteroatomer, så som for eksempel nitrogen, svovel og oksygen. Et bindeledd kan, for eksempel, i noen utførelsesformer omfatte en eller flere eter-, ester-, eller amidgrupper.

25

Enhver kjemisk gruppe av bindeleddet (så som for eksempel alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, heterocyklyl, acyloksy, alkoksy, aryloksy, og heterocyklyloksy) kan være substituert eller usubstituert, med mindre annet er angitt. Substituenten kan velges fra for eksempel acyl, acylamino, acyloksy,

30 alkenyl, alkoksy, alkyl, alkynyl, amido, amino, aryl, aryloksy, azido, karbamoyl, karboalkoksy, karboksy, cyano, cykloalkyl, formyl, guanidino, halo, heteroaryl, heterocyklyl, hydroksy, iminoamino, nitro, okso, fosfonamino, sulfinyl, sulfonamino, sulfonat, sulfonyl, tio, tioacylamino, tioureido, og ureido. Substituentene kan selv være substituert eller usubstituert, og kan være avbrutt

35 eller terminert ved ett eller flere heteroatomer, så som, for eksempel, nitrogen, svovel, og oksygen.

I visse utførelsesformer kan et oligosakkarid omfatte minst en beskyttende gruppe. Betegnelsen "beskyttende gruppe" refererer til en hvilken som helst substituent som kan anvendes for å forhindre en funksjonell gruppe (så som, for eksempel en amingruppe, en karboksylgruppe, en hydroksylgruppe, en hydrazingruppe, en hydrazidgruppe, en semikarbazidgruppe, eller en tiosemikarbazidgruppe) på et molekyl fra å undergå en kjemisk reaksjon under den kjemiske endringen på annet sted i molekylet. En beskyttende gruppe kan fjernes under egnede kjemiske betingelser. Tallrike beskyttende grupper er kjente for fagmannen, og eksempler på beskyttende grupper, fremgangsmåter for deres tilsetning og fremgangsmåter for deres fjernelse kan finnes i, f.eks. Greene et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. utgave, John Wiley and Sons: New York, 1999 og Kocienski, *Protecting Groups*, 3. utgave, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Tyskland, 2005, hvis beskrivelser er innbefattet heri som henvisninger. I visse utførelsesformer kan oligosakkaridet omfatte minst en beskyttende gruppe valgt fra hydroksylbeskyttende grupper, karboksylbeskyttende grupper, og aminbeskyttende grupper. I andre utførelsesformer kan et oligosakkarid være "ubeskyttet," og kan ikke omfatte noen beskyttende grupper.

Et oligosakkarid kan være isolert fra en naturlig kilde eller kan fremstilles ved kjemisk eller enzymatisk syntese. Et oligosakkarid isolert fra en naturlig kilde kan være homogent eller kan være en heterogen blanding av beslektede oligosakkarider. I noen utførelsesformer kan et oligosakkarid være fremstilt ved kjemisk eller enzymatisk modifikasjon av et oligosakkarid isolert fra en naturlig kilde ("semi-syntese"). I noen utførelsesformer kan oligosakkaridet være et syntetisk oligosakkarid som har den kjemiske strukturen av et naturlig forekommende oligosakkarid.

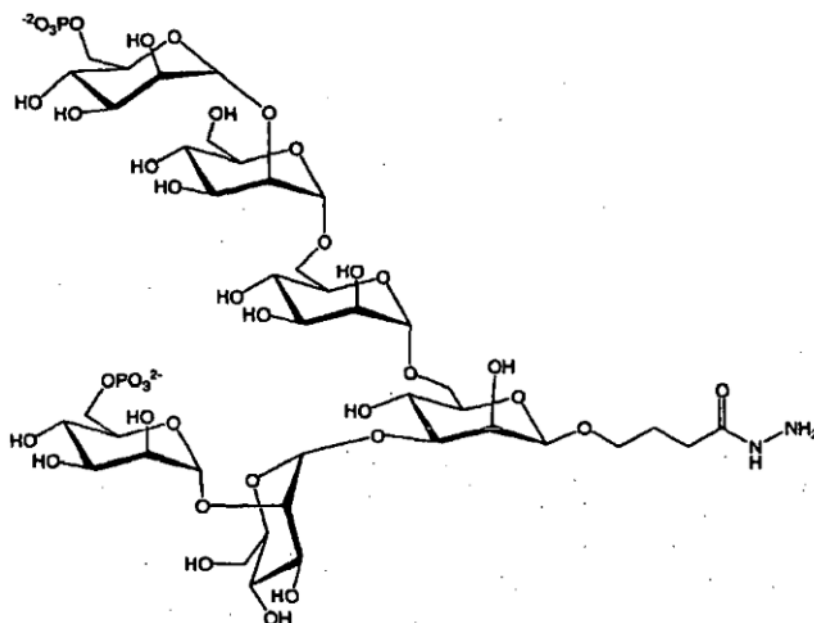
I noen utførelseformer kan et oligosakkarid omfatte et monosakkarid som gjenkjennes av en spesiell reseptor. Monosakkaridet gjenkjent av en spesiell reseptor kan velges fra for eksempel galaktose, GalNAc, mannose, M6P, glukose, GlcNAc, sialinsyre, eller sulfatert sialinsyrerest. Et oligosakkarid kan, i visse utførelsesformer, omfatte minst en M6P rest, så som, for eksempel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, eller 10 M6P rester.

Monosakkaridet gjenkjent av en spesiell reseptor kan, i noen utførelsesformer, være et nest-siste monosakkarid eller et terminalt monosakkarid. I noen

utførelsesformer kan monosakkaridet gjenkjent av en spesiell reseptor være en terminal galaktose, mannose, M6P, glukose, GlcNAc, eller sialinsyrerest. Et oligosakkarid kan, i noen utførelsesformer, inneholde minst 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 terminale M6P rester.

5

I visse utførelsesformer kan oligosakkaridet omfattende en reaktiv gruppe være et M6P-holdig heksasakkarid av formel **Ia**:

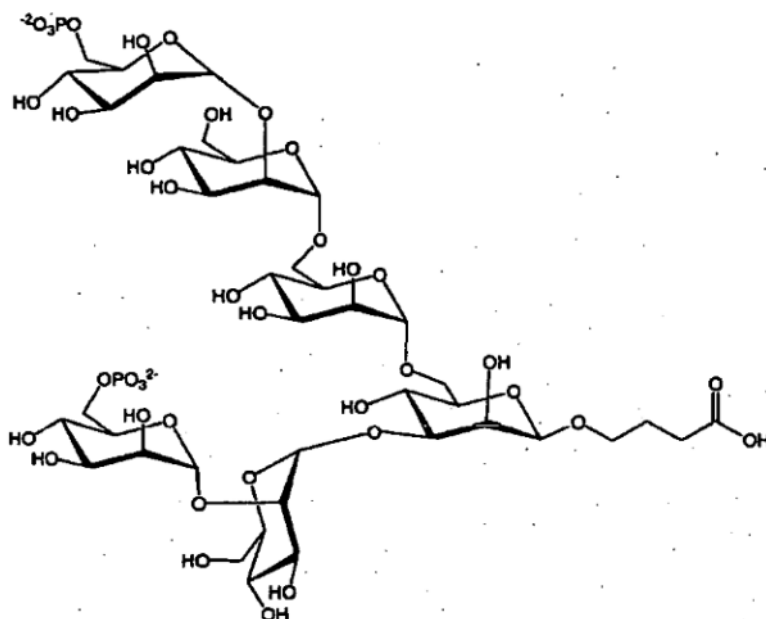
Formel **Ia**

10

Oligosakkaridet av formel **1a** kan beskrivas som butyrylhydrazin-4-yl 6-O-fosfono- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -o-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-[6-O-fosfono- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-mannopyranosid.

15

I visse utførelsesformer kan oligosakkaridet omfattende en reaktiv gruppe være et M6P-holdig heksasakkarid av formel **Ib**:

Formel **Ib**

B. Aminooksyforbindelse

5

Som anvendt heri kan en aminooksyforbindelse være en hvilken som helst forbindelse omfattende en aminooksygruppe og en andre reaktiv gruppe, hvori den andre reaktive gruppen kan reagere med den første reaktive gruppen på et oligosakkarid for å danne en kovalent binding. I noen utførelsesformer kan for eksempel den andre reaktive gruppen være en karboksyl-, ester- (så som, for eksempel en aktivert ester), acylhalid- (så som for eksempel et acylfluorid eller acylklorid), acylazid-, anhydrid-, isotiocyanat-, isocyanat-, eller sulfonylhalid- (så som for eksempel en sulfonylklorid eller sulfonylbromid) gruppe. I andre utførelsesformer kan den andre reaktive gruppen for eksempel være en hydrazingruppe, hydrazidgruppe, semikarbazidgruppe, tiosemikarbazid-, eller amingruppe.

10

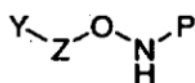
15

20

I visse utførelsesformer er nitrogenet av aminooksygruppen av aminooksyforbindelsen beskyttet med en aminobeskyttende gruppe. Tallrike aminobeskyttende grupper er kjente for fagmannen, og eksempler på aminobeskyttende grupper, fremgangsmåter for deres tilsetning, og fremgangsmåter for deres fjernelse kan finnes på side 494-653 av Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 3. utgave, John Wiley and Sons: New

York, 1999; Kap. 8 av Kocienski, Protecting Groups, 3. utgave., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Tyskland, 2005; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag: New York, 1993; Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press: Boca Raton, FL, 1997; og
 5 Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2. utgave., Pierce Chemical Co.: Rockford, IL, 1984, hvis beskrivelser er innbefattet heri som henvisning.

I noen utførelsesformer er aminooksyforbindelsen valgt fra forbindelser av formel **II**:

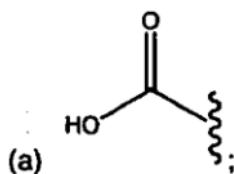


Formel **II**

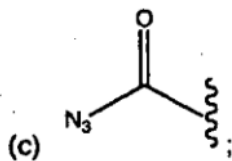
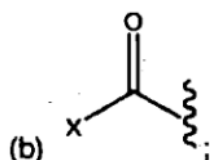
15 hvori Y er den andre reaktive gruppen, Z er valgt fra alkyl, alkenyl, alkynyl, heteroaryl, aryl, og heterocyklyl, og P er valgt fra aminobeskyttende grupper.

Som anvendt heri kan en hvilken som helst kjemisk gruppe på aminooksyforbindelsen (så som for eksempel alkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, heterocyklyl, acyloksy, alkoksy, aryloksy, og heterocyklyloksy) være
 20 substituert eller usubstituert, og kan være avbrutt ved en eller flere kjemiske grupper, med mindre annet er angitt. Substituenten og avbrytende grupper kan velges fra for eksempel acyl, acylamino, acyloksy, alkenyl, alkoksy, alkyl, alkynyl, amido, amino, aryl, aryloksy, azido, karbamoyl, karboalkoksy, karboksy, cyano, cykloalkyl, formyl, guanidino, halo, heteroaryl, heterocyklyl, hydroksy, iminoamino, nitro, okso, fosfonamino, sulfinyl, sulfonamino, sulfonat, sulfonyl,
 25 tio, tioacylamino, tioureido og ureido. Substituentene kan selv være substituerte eller usubstituerte, og kan være avbrutt eller terminert med ett eller flere heteroatomer, så som for eksempel nitrogen, svovel og oksygen.

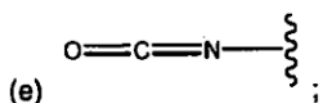
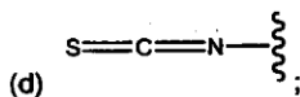
30 I visse utførelsesformer kan Y være valgt fra for eksempel:



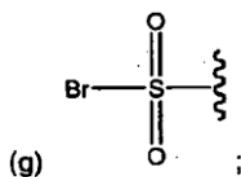
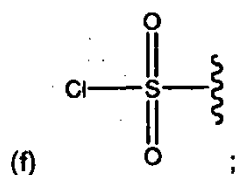
15



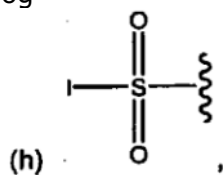
5



10



og

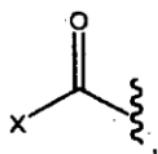


15

hvor X er valgt fra halogener, azid, acyloksy, alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy og heterocyklyloksy.

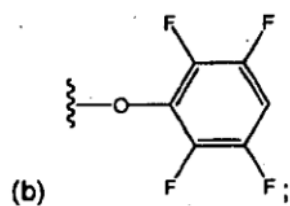
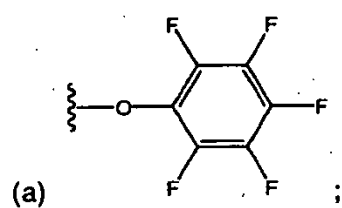
20

I visse utførelsesformer er aminooksyforbindelsen en aktivert ester. Som anvendt heri er en aktivert ester en ester som reagerer for å danne en amidbinding under milde betingelser. Generelt er en aktivert ester en ester av en relativt sur alkohol. I visse utførelsesformer er aminooksyforbindelsen av formel **II** en aktivert ester av formel

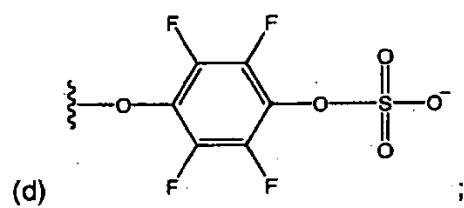
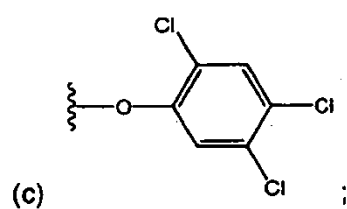


og X er valgt fra alkoksy, aryloksy, heteroaryloksy og heterocyklyloksy. For eksempel kan X være valgt fra:

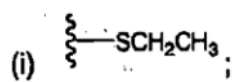
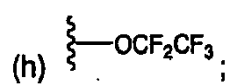
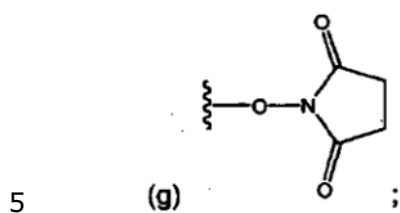
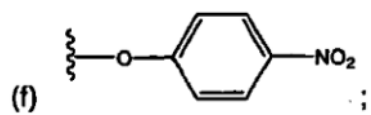
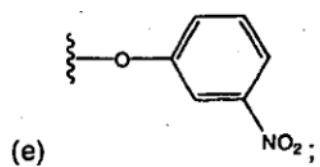
5



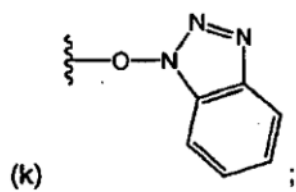
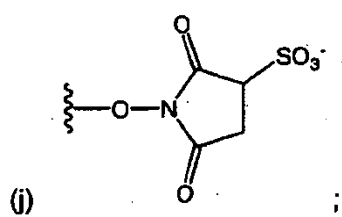
10



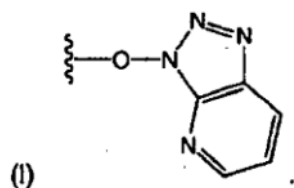
17



10



og



I andre utførelsesformer er Y valgt fra for eksempel hydrazid, hydrazin, tiosemikarbazid, semikarbazid og amingrunder.

5

I noen utførelsesformer kan Z innbefatte for eksempel en karbonyl-, eter-, ester-, eller amidgruppe. I noen utførelsesformer kan Z f.eks. være alkyl avbrutt ved ett eller flere heteroatomer, så som en oligoetylenglykol. For eksempel kan Z være monoetylenglykol, dietylenglykol, trietylenglykol, tetraetylenglykol, eller større oligoetylenglykol.

10

I noen utførelsesformer kan Z for eksempel være alkyl substituert med okso og avbrutt ved ett eller flere heteroatomer, så som et oligopeptid. For eksempel kan oligopeptidet omfatte en, to, tre, fire, fem, seks eller flere komponentaminosyrer. Aminosyrene kan for eksempel være α -aminosyrer, β -aminosyrer, γ -aminosyrer, δ -aminosyrer, og ω -aminosyrer. En aminosyre kan ha R eller S kiralitet ved et hvilket som helst kiralt atom. En aminosyre kan velges fra for eksempel alanin, β -alanin, α -aminoadipinsyre, 2-aminobutansyre, 4-aminobutansyre, 1-aminocyklopentankarboksylyse, 6-aminoheksansyre, 2-aminoheptandisyre, 7-aminoheptansyre, 2-aminoisosmørsyre, aminometylpyrrolkarboksylyse, 8-amino-3,6-dioksa-oktansyre, aminopiperidinkarboksylyse, 3-amino-propionsyre, aminoserin, aminotetrahydropyran-4-karboksylyse, arginin, asparagin, aspartinsyre, azetidinkarboksylyse, benzotiazolylalanin, butylglycin, karnitin, 4-klorfenylalanin, citrullin, cykloheksylalanin, cykloheksylstatin, cystein, 2,4-diaminosmørsyre, 2,3-diaminopropionsyre, dihydroksyfenylalanin, dimetyltiazolidinkarboksylyse, glutaminsyre, glutamin, glycin, histidin, homoserin, hydroksyprolin, isoleucin, isonipecotinsyre, leucin, lysin, metanoprolin, metionin, norleucin, norvalin, ornitin, p-aminobenzosyre, penicillamin, fenylalanin, fenylglycin, piperidinyllalanin, piperidinylglycin, prolin, pyrrolidinyllalanin, sarkosin, selenocystein, serin, statin, tetrahydropyranglycin, tienylalanin, treonin, tryptofan, tyrosin, valin, allo-isoleucin, allo-treonin, 2,6-diamino-4-heksansyre, 2,6-diaminopimelinsyre, 2,3-diaminopropionsyre,

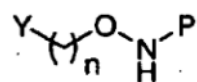
25

30

dikarboksidin, homoarginin, homocitrullin, homocystein, homocystin, homofenylalanin, homoprolin og 4-hydrazinobenzosyre.

P kan velges fra aminobeskyttelsesgrupper kjente for fagmannen. I noen utførelsesformer kan P være en karbamatbeskyttende gruppe, så som for eksempel en (9-fluorenylmetyl)karbamate (Fmoc), (tert-butyloksy)karbamate (t-Boc), (trikloretyl)karbamate (Troc) eller allylkarbamate (Alloc) beskyttende gruppe. I andre utførelsesformer kan P være en ikke-karbamatbeskyttende gruppe, så som for eksempel en amidbeskyttende gruppe så som en ftalimid- eller en trifluoracetamidbeskyttende gruppe.

I noen utførelsesformer er aminooksyforbindelsen av formel **II** valgt fra forbindelser av formel **III**:

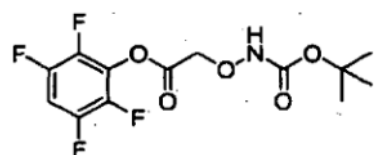


Formel **III**

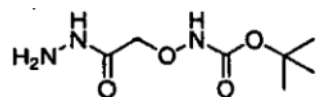
hvor Y og P er som beskrevet ovenfor, og n er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10.

I visse utførelsesformer kan n være valgt fra heltall fra følgende områder: 1-4, 2-6, 2-8, 3-6 og 4-10. I illustrerende utførelsesformer er n 1.

I en illustrerende utførelsesform er aminooksyforbindelsen t-Boc-aminooksyeddiksyretetrafluorfenylester, hvis struktur er angitt nedenfor.



I en annen illustrerende utførelsesform har aminooksyforbindelsen strukturen angitt nedenfor.



C. Fremgangsmåter for fremstilling av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe

5

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe fra et oligosakkarid omfattende en reaktiv gruppe. Fremgangsmåten omfatter:

10

- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en første reaktiv gruppe;
- (b) tilveiebringelse av en aminoksyforbindelse omfattende en andre reaktiv gruppe; og

15

- (c) omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridet med den andre reaktive gruppen av aminoksyforbindelsen,
- for derved å fremstille oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe.

20

Oligosakkaridet omfattende en første reaktiv forbindelse kan være f.eks. et hvilket som helst oligosakkarid som omfatter en reaktiv gruppe som beskrevet ovenfor. I illustrerende utførelsesformer er oligosakkaridet omfattende en første reaktiv gruppe et oligosakkarid av formel **Ia** eller et oligosakkarid av formel **Ib**. Aminoksyforbindelsen omfattende en andre reaktiv gruppe kan være en hvilken som helst aminoksyforbindelse omfattende en reaktiv gruppe som beskrevet ovenfor.

25

30

Betegnelsene "første reaktive gruppe" og "andre reaktive gruppe", som anvendt heri, betegner ingen spesiell eksperimentell rekkefølge. Det vil si at trinn (c), omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridene med den andre reaktive gruppen av aminoksyforbindelsen, kan utføres ved en hvilken som helst rekkefølge for tilsats av reaktantene. For eksempel kan oligosakkaridet omfattende en første reaktiv gruppe tilsettes til aminoksyforbindelsen omfattende den andre reaktive gruppen eller vice versa. I et annet eksempel kan

både oligosakkaridet og aminooksyforbindelsen tilsettes samtidig til en reaksjonsbeholder.

Trinn (c) kan finne sted under hvilke som helst egnede betingelser (f.eks. løsningsmiddel og temperatur) som er kjente for fagmannen. I visse utførelsesformer kan en eller flere ytterligere reagenser, så som f.eks. koplingsreagenser og katalysatorer være til stede under trinn (c). En koplingsreagens, som anvendt heri, er en reagens som kan anvendes for å danne en kovalent binding mellom den første reaktive gruppen og den andre reaktive gruppen.

I visse utførelsesformer, så som f.eks. når den første eller andre reaktive gruppen er en karboksylgruppe, kan reaksjonsbetingelsene omfatte en koplingsreagens. Koplingsreagenser kan velges fra f.eks. fosfoniumkoplingsreagenser, så som f.eks.: BOP (benzotriazol-1-yl-oksy-tris-(dimetylamino)-fosfoniumheksafluorfosfat), PyBOP® (benzotriazol-1-yl-oksy-tris-pyrrolidino-fosfoniumheksafluorfosfat), og PyBroP® (brom-tris-pyrrolidino-fosfoniumheksafluorfosfat) og fra aminium (uronium) koplingsreagenser så som f.eks., HBTU

(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorfosfat), HATU (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumheksafluorfosfat), TBTU (2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluroniumtetrafluorborat).

Koplingsreagenser kan også velges fra f.eks. karbodiimidkoplingsreagenser så som f.eks. DIC (1,3-diisopropylkarbodiimid), CDI (1,1' karbonyldiimidazol), og EDC (1-etyl-3-(3-dimetylamino)propyl)-karbodiimid). I noen illustrerende utførelsesformer er koplingsreagensen f.eks. EDC. I visse utførelsesformer omfatter reaksjonsbetingelsene både en koplingsreagens og en katalysator.

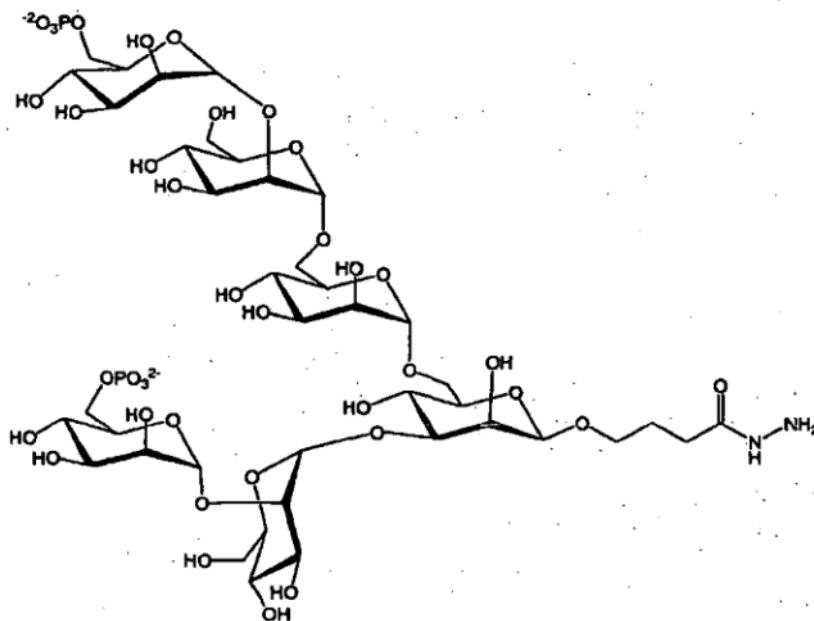
Reaksjonsbetingelsene kan, i visse utførelsesformer, omfatte en katalysator. Katalysatoren kan velges fra en hvilken som helst egnet katalysator som er kjent innen teknikken, så som for eksempel DHBt-OH (3-hydroksey-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on), HOBt (N-hydrokseybenzotriazol), DMAP (4-dimetylamino)pyridin, NHS (N-hydroksey-suksinimid), N-hydroksey-sulfosuksinimid, HONB (N-hydroksey-5-norbornen-endo-2,3-dikarboksimid) eller et tetrabutylammoniumsalt, så som for eksempel TBAI (tetrabutylammoniumiodid). I noen illustrerende utførelsesformer omfatter reaksjonsbetingelsene katalysatoren DHBt-OH eller katalysatoren NHS.

I noen utførelsesformer resulterer trinn (c), omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridet med den andre reaktive gruppen av aminooksyforbindelsen i dannelsen av en amidbinding. Betingelser som er egnede for dannelsen av en amidbinding er velkjente for fagmannen og er beskrevet for eksempel i Chan et al., red., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press: New York, 2000; Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer Verlag: New York, 1993; Lloyd-Williams et al., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press: Boca Ration, FL, 1997; og Novabiochem® (San Diego, CA) Catalog.

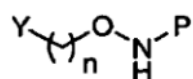
I visse utførelsesformer omfatter aminooksyforbindelsen en aminobeskyttende gruppe og fremgangsmåten omfatter et ytterligere trinn (d), avbeskyttelse av oligosakkaridet omfattende en aminooksygruppe for å fjerne den aminobeskyttende gruppen. Avbeskyttelse kan finne sted under hvilke som helst egnede betingelser kjente for fagmannen, så som de som er beskrevet for eksempel på side 494-653 av Greene et al., Protective Groups in Organic Synthesis, 3. utgave., John Wiley and Sons: New York, 1999 og Kocienski, Protecting Groups, 3. utgave., Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Tyskland, 2005, hvis oppfinnelser er innbefattet heri som henvisning.

En illustrerende utførelsesform av fremgangsmåten ifølge beskrivelsen tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av et M6P-holdig oligosakkarid omfattende en aminooksygruppe. Fremgangsmåten omfatter:

(a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en første reaktiv gruppe, hvori



(b) tilveiebringelse av en aminoksyforbindelse omfattende en andre reaktiv gruppe, hvori aminoksyforbindelsen er valgt fra forbindelser av formel III:



5

Formel **III**

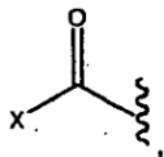
hvori n er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10, P er valgt fra aminobeskyttende grupper og Y er en andre reaktiv gruppe; og

10

(c) omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridet med den andre reaktive gruppen av aminoksyforbindelsen,

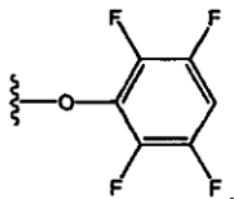
for derved å fremstille oligosakkaridet omfattende en aminoksyforbindelse.

I visse utførelsesformer er Y i formel **III**

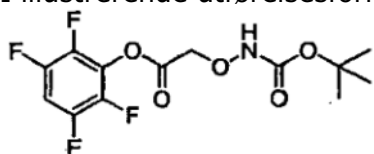


15

hvor X er valgt fra hydroksy, aryloksy, heteroaryloksy, og heterocyklyloksy. I visse illustrerende utførelsesformer er X for eksempel



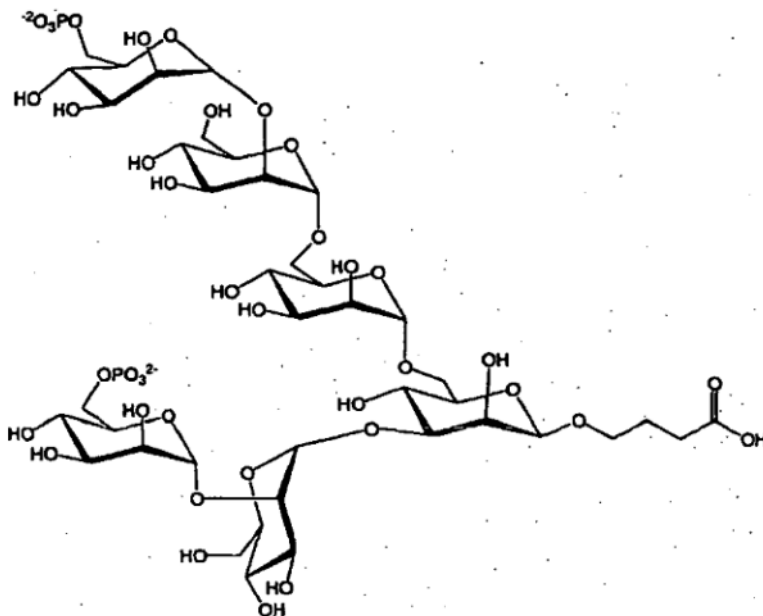
I illustrerende utførelsesformer er aminoksyforbindelsen



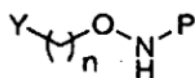
- 5 I visse utførelsesformer kan den første reaktive gruppen av oligosakkaridet omsettes med den andre reaktive gruppen av amionoksyforbindelsen i nærvær av et koplingsmiddel, så som for eksempel EDC, og/eller en katalysator, så som for eksempel DHBt-OH.

- 10 En annen illustrerende utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter:

(a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en første reaktiv gruppe, hvori oligosakkaridet er



- 15 (b) tilveiebringelse av en aminoksyforbindelse omfattende en andre reaktiv gruppe, hvor aminoksyforbindelsen er valgt fra forbindelser av formel **III**:

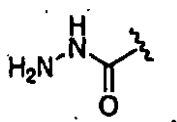


Formel **III**

hvor i er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10, P er valgt fra aminobeskyttende grupper og Y er en andre reaktiv gruppe; og

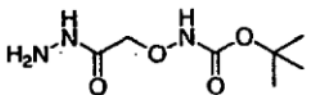
- 5 (c) omsetning av den første reaktive gruppen av oligosakkaridet med den andre reaktive gruppen av aminooksyforbindelsen, for derved å fremstille oligosakkaridet omfattende en aminooksygruppe.

- 10 I visse utførelsesformer er Y i formel **III** en hydrazin-, hydrazid-, aminooksy-, tiosemikarbazid-, semikarbazid-, eller amingruppe. I visse utførelsesformer er Y i formel **III**



I illustrerende utførelsesformer er aminooksyforbindelsen

15



- 20 I visse utførelsesformer kan den første reaktive gruppen av oligosakkaridet omsettes med den andre reaktive gruppen av aminooksyforbindelsen i nærvær av et koplingsmiddel, så som for eksempel EDC, og/eller en katalysator, så som for eksempel NHS.

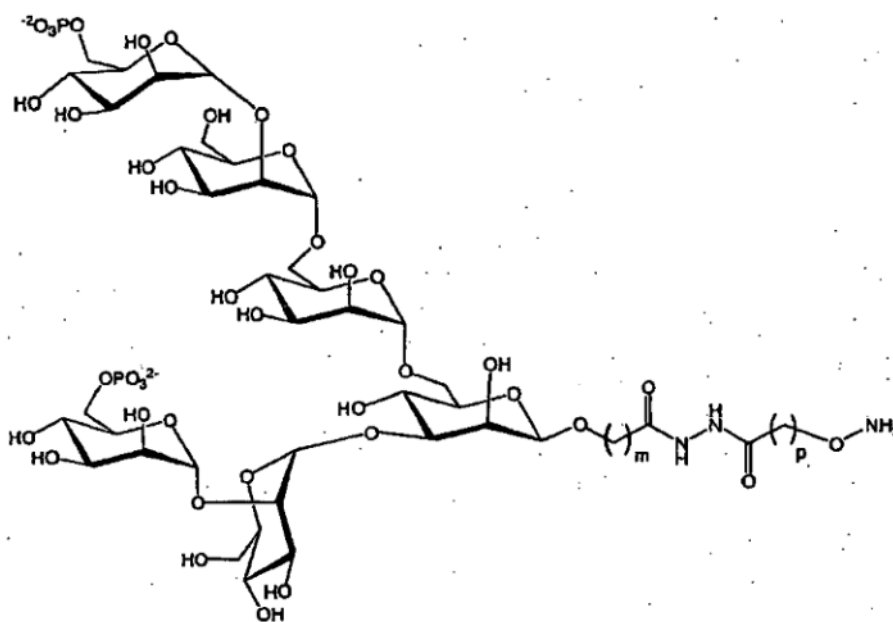
II. Oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe

- 25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe. I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen oligosakkarider omfattende en aminooksygruppe fremstilt ved fremgangsmåtene

beskrevet ovenfor. Oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe kan omfatte for eksempel minst 2, 3, 4, 5, 6 eller flere monosakkarider, omfattende for eksempel minst en galaktose, GalNAc, mannose, M6P, glukose, GlcNAc, sialinsyre eller sulfatert sialinsyrerest. Et slikt oligosakkarid kan være mono-, bi-, tri-, tetra- eller penta-grenet av struktur, og kan inneholde 0, 1, 2, 3, 4 eller flere forgreningspunkter.

I noen utførelsesformer tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et oligosakkarid omfattende (1) en aminoksygruppe og (2) mannose-6-fosfat. Oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe kan, i visse utførelsesformer, omfatte for eksempel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 M6P rester. I noen utførelsesformer kan oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe omfatte minst 1, 2, 3, 4 eller flere terminale eller penultimate M6P rester.

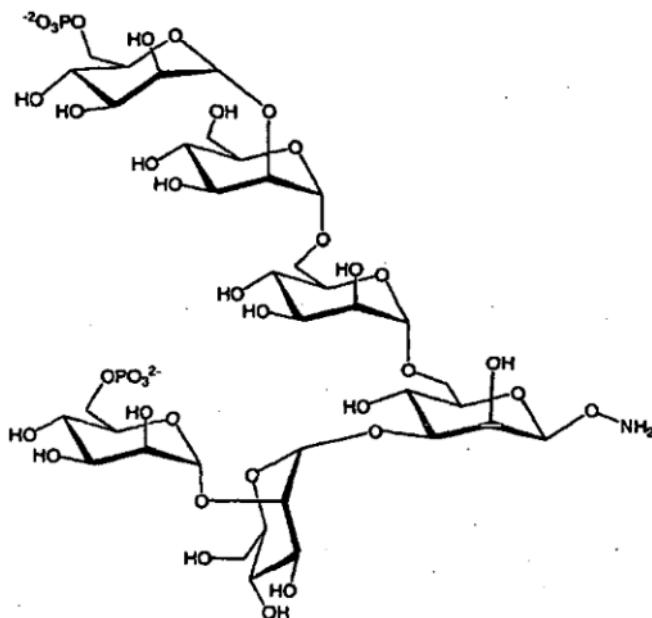
Oligosakkaridene omfattende en aminoksygruppe er, i visse utførelsesformer, valgt fra oligosakkarider av formel **IV**:



Formel **IV**

hvor m og p uavhengig er valgt fra heltall fra 1 til 10. I visse utførelsesformer kan for eksempel m og p være heltall uavhengig valgt fra følgende områder: 1-4, 2-6, 2-8, 3-6 og 4-10. I illustrerende utførelsesformer er m 3 og p er 1.

I andre utførelsesformer er aminoksygruppen direkte forbundet til den reduserende enden av oligosakkaridet. I noen utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse kan oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe for eksempel være et oligosakkarid av formel V:



5

Formel V

III. Konjugering av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe med et protein

10

A. Oligosakkarid

Oligosakkaridet som skal konjugeres med et protein kan velges fra et hvilket som helst oligosakkarid omfattende en reaktiv gruppe, som diskutert ovenfor, og fra et hvilket som helst oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe, som diskutert ovenfor. I noen utførelsesformer kan for eksempel oligosakkaridet som skal konjugeres være et oligosakkarid av formel **Ia**, formel **Ib**, formel **IV** eller formel **V**.

15

20

B. Protein

Konjugeringsfremgangsmåtene beskrevet heri er bredt anvendbare for et hvilket som helst rent protein, delvis rensset protein eller fragment derav som har minst en karbonylgruppe (hvor en karbonylgruppe er et keton eller et aldehyd),
5 innbefattende isolerte proteiner og rekombinant eller syntetisk fremstilte proteiner. Betegnelsene "rent", "renset" og "isolert" refererer til et molekyl som er fritt fra sitt naturlige miljø. For eksempel er et rent protein i det vesentlige fritt for cellulært materiale og/eller andre proteiner fra celle- eller vevskilden hvorfra det er avledet. Betegnelsen refererer til preparater som er for eksempel
10 minst 70% til 80%, 80% til 90%, 90 til 95%; eller minst 95%, 96%, 97%, 98%, 99% eller 100% (vekt/vekt) rene.

I andre utførelsesformer kan proteinet være et enzym som har en optimal aktivitet, som målt ved en aktivitetsanalyse, ved en pH varierende fra 1-7, så
15 som for eksempel 1-3, 2-5, 3-6, 4-5, 5-6 eller 4-6. Enzymet kan for eksempel ha et pH-optimum ved en pH varierende fra 4-6.

I noen utførelsesformer kan proteinet være et enzym som har et isoelektrisk punkt (pi) varierende fra 1 til 8, så som f.eks. fra 1-3, 2-5, 3-8, 4-5, 5-6, 4-6, 5-
20 8, 6-8 eller 7-8. Pi-verdien av et protein kan måles ved å anvende f.eks. isoelektrisk fokuserende gelelektroforese.

I noen utførelsesformer oppnås proteinet inneholdende en karbonylgruppe ved anvendelsen av et ekspresjonsystem som har en ekspandert genetisk kode, for
25 eksempel som beskrevet i Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003). I et slikt tilfelle kan karbonylgruppen være lokalisert på aminosyresidekjeden, som translatert.

I visse utførelsesformer er proteinet som har minst en karbonylgruppe et protein
30 som har minst ett oligosakkarid (dvs. et glykoprotein). For eksempel kan et glykoprotein som har minst en karbonylgruppe oppnås ved oksidasjon av dette glykoproteinet ved en hvilken som helst måte kjent for fagmannen. I noen utførelsesformer kan for eksempel et glykoprotein som har minst en karbonylgruppe oppnås ved oksidasjon av dette glykoproteinet med periodat (for
35 eksempel natriumperiodat) eller med galaktoseoksidase. I et slikt tilfelle kan karbonylgruppen være lokalisert ved et proteinglykosyleringssete.

I visse utførelseformer er proteinet som har minst en karbonylgruppe et glykoprotein, så som et terapeutisk glykoprotein. Et terapeutisk glykoprotein kan være målrettet til lysosomet ved konjugering med et oligosakkarid omfattende mannose-6-fosfat. Glykoproteinet kan for eksempel være et lysosomalt enzym, innbefattende et ERT enzym. Enzymet kan være en lysosomal hydrolase, innbefattende de oppført i tabell 1. I visse utførelsesformer er den lysosomale hydrolasen valgt fra for eksempel α -glukosidase, α -galaktosidase A, og sur sfingomyelinase. I visse utførelsesformer er den lysosomale hydrolasen GAA.

10 **Tabell 1:** Eksempler på LSDer og tilsvarende lysosomale hydrolaser

Lysosomal lagringsforstyrrelse	Defekt enzym
Fabry	α -Galaktosidase A
Farber	Sur ceramidase
Fucosidose	Sur α -L-fukosidase
Gaucher typer 1, 2, og 3	Sur β -glukosidase
G _{M1} gangliosidose	Sur β -galaktosidase
Hunter (Mucopolysaccharidosis (MPS II))	Iduronat-2-sulfatase
Hurler-Scheie, Hurler, Scheie (MPS I)	α -L-Iduronidase
Krabbe	Galaktocerebrosidase
α -Mannosidosis	Sur α -mannosidase
β -Mannosidosis	Sur β -mannosidase
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Arylsulfatase B
Metakromatisk leukodystrofi	Arylsulfatase A
Morquio A (MPS IV)	N-Acetylgalaktosamin-6-sulfat sulfatase
Morquio B (MPS IV)	Sur β -galakosidase
Niemann-Pick A and B	Sur sfingomyelinase (ASM)
Pompe	Sur α -glukosidase (α -glukosidase; GAA)
Sandhoff	β -Heksosaminidase B

Lysosomal lagringsforstyrrelse	Defekt enzym
Sanfilippo A (MPS III)	Heparan <i>N</i> -sulfatase
Sanfilippo B (MPS III)	α - <i>N</i> -Acetylglukosaminidase
Sanfilippo C (MPS III)	Acetyl-CoA: α -glukosaminid
	<i>N</i> -acetyltransferase
Sanfilippo D (MPS III)	<i>N</i> -Acetylglukosamin-6-sulfat sulfatase
Schindler-Kanzaki	α - <i>N</i> -acetylgalaktosaminidase
Sialidosis	Sialidase
Sly (MPS VII)	β -Glukuronidase
Tay-Sachs	β -Heksosaminidase A

5 I visse utførelsesformer kan glykoproteinet være et glykoprotein som har minst 1, 2, 3, 4, 5 eller flere *N*-forbundede eller *O*-forbundede glykosylerte aminosyrerester. I andre utførelsesformer kan proteinet ha 1, 2, 3, 4, 5 eller flere konsensussteder for *N*-forbundet eller *O*-forbundet glykosylering, hvorav minst ett er glykosylert.

10 I visse utførelsesformer kan proteinet være en ligand for en reseptor. I noen utførelsesformer kan proteinet for eksempel være et glykoprotein som binder til en reseptor som gjenkjenner et sukker, så som for eksempel mannose eller mannose-6-fosfat. I noen utførelsesformer kan glykoproteinet binde til for eksempel asialoglykoproteinreseptoren, den kationavhengige mannose-6-fosfatreseptoren, den insulin-liknende vekstfaktor II/kation-uavhengige mannose-6-fosfatreseptoren eller makrofagmannosereseptoren.

20 I visse utførelsesformer er proteinet et glykoprotein som, når det konjugeres til et oligosakkarid omfattende mannose-6-fosfat, internaliseres mer effektivt ved en målcelle (for eksempel via CI-MPR-mediert endocytose) enn det tilsvarende ukonjugerte glykoproteinet. Det konjugerte glykoproteinet kan f.eks. internaliseres mer effektivt enn det ukonjugerte glykoproteinet ved for eksempel minst 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% eller 90% (vekt/vekt) i en gitt tidsperiode. I andre utførelsesformer kan minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 ganger (vekt/vekt) så mye av det konjugerte glykoproteinet

bli internalisert, relativt til det ukonjugerte glykoproteinet, i en gitt tidsperiode. Referansetidsperioden kan for eksempel være 10, 30, 45 minutter eller 1, 2, 3, 5, 6, 12, 24, 48 eller 72 timer, eller mer.

5 **C. Fremgangsmåter for kopling av et oligosakkarid til et protein**

Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for kopling av et oligosakkarid til et protein, så som for eksempel et glykoprotein. I en utførelsesform omfatter fremgangsmåten:

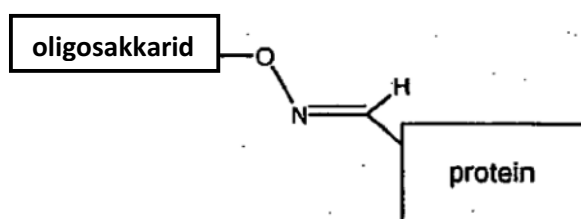
- 10 (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminooksygruppe;
 (b) tilveiebringelse av et protein som har minst en karbonylgruppe; og
 (c) omsetning av aminooksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av proteinet,
 for derved å kople oligosakkaridet til proteinet.

15 I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene videre tilsetning av et reduserende middel til det koplede lysosomale enzymet. Det reduserende midlet kan være et hvilket som helst reduserende middel kjent for fagmannen, så som for eksempel natriumcyanoborhydrid eller natriumtriacetoksyborhydrid (STAB).

20

IV. Oligosakkarid-proteinkonjugater

Oppfinnelsen tilveiebringer videre et oligosakkarid-proteinkonjugat, omfattende (1) et protein, (2) et oligosakkarid, og (3) en oksimgruppe som forbinder
 25 proteinet og oligosakkaridet. I visse utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen et oligosakkarid-proteinkonjugat fremstilt ved fremgangsmåtene beskrevet ovenfor. Oligosakkarid- og proteinkomponentene av konjugatet kan for eksempel være et hvilket som helst oligosakkarid og protein beskrevet heri, hvor et konjugat derav omfatter en oksimgruppe, som angitt nedenfor. (Oksimgruppen
 30 angitt nedenfor er formelt avledet ved omsetning av en aminooksygruppe og en aldehydgruppe; oksimgrupper formelt avledet ved omsetning av en aminooksygruppe og en ketongruppe er også omfattet av foreliggende oppfinnelse.)



I visse utførelsesformer er oligosakkarid-proteinkonjugatet et oligosakkarid-glykoproteinkonjugat. I visse utførelsesformer er oligosakkarid-proteinkonjugatet konjugatet av et oligosakkarid omfattende minst en M6P og av en lysosomal hydrolase.

V. – Farmasøytiske sammensetninger

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer anvendelsen av et konjugat ifølge oppfinnelsen ved fremstillingen av et medikament for behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse. Den omfatter også farmasøytiske sammensetninger omfattende et oligosakkarid-proteinkonjugat ifølge oppfinnelsen. I noen utførelsesformer omfatter de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen et konjugat av et oligosakkarid omfattende minst en M6P og et lysosomalt enzym.

Farmasøytiske sammensetninger ifølge oppfinnelsen kan omfatte ett eller flere egnede farmasøytiske hjelpestoffer. Standard farmasøytiske formuleringsteknikker og hjelpestoffer er velkjente for fagmannen (se for eksempel 2005 Physicians' Desk Reference®, Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennado et al., Eds. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000. Sammensetningen kan, men behøver ikke, inneholde konserveringsmidler. I noen utførelsesformer kan farmasøytiske sammensetninger omfattende α -galaktosidase A konjugater omfatte ett eller flere hjelpestoffer, så som, f.eks. mannitol, natriumfosfat enverdig monohydrat, og/eller natriumfosfat toverdig heptahydrat. I noen utførelsesformer kan farmasøytiske sammensetninger omfattende konjugater av α -glukosidase omfatte ett eller flere hjelpestoffer, så som, f.eks. mannitol, polysorbat 80, natriumfosfat toverdig heptahydrat og natriumfosfat enverdig monohydrat.

Den farmasøytiske sammensetningen kan omfatte hvilke som helst av konjugatene som er beskrevet heri som eneste aktive forbindelse eller i kombinasjon med en annen forbindelse, sammensetning eller biologisk materiale. Den farmasøytiske sammensetningen kan for eksempel også omfatte ett eller flere små molekyler som er nyttige for behandling av en LSD og/eller en bivirkning assosiert med LSD. I noen utførelsesformer kan sammensetningen omfatte miglustat og/eller en eller flere forbindelser beskrevet i for eksempel U.S. patentsøknader med publikasjonsnumre 2003/0050299, 2003/0153768; 2005/0222244; 2005/0267094.

Formuleringen av farmasøytiske sammensetninger kan variere avhengig av den planlagte administreringsmåten og andre parametre (se, f.eks. Rowe et al. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4. utgave., APhA Publications, 2003.) I noen utførelsesformer kan sammensetningen være en steril, ikke-pyrogen, hvit til beige hvit lyofilisert kake eller et pulver som skal administreres ved intravenøs injeksjon etter rekonstituering med sterilt vann for injeksjon, USP.

Administrering av en farmasøytisk sammensetning ifølge oppfinnelsen er ikke begrenset til noe spesielt avleveringsystem og kan, uten begrensning, innbefatte parenteral (innbefattende subkutan, intravenøs, intrakranial, intramedullær, intraartikulær, intramuskulær, intratekal eller intraperitoneal injeksjon), transdermal, eller oral (for eksempel, i kapsler, suspensjoner eller tabletter). Administrering til et individ kan finne sted i en enkeltdose eller ved gjentatte administreringer, og i en hvilken som helst av en rekke fysiologisk akseptable saltformer, og/eller med en akseptabel farmasøytisk bærer og/eller additiv som del av en farmasøytisk sammensetning.

Konjugatene som her er beskrevet administreres i terapeutisk effektive mengder. Generelt kan en terapeutisk effektiv mengde variere med objektets alder, tilstand og kjønn så vel som graden av den medisinske tilstanden i objektet. Doseringen kan bestemmes av en lege og justeres, etter behov, for å tilpasses til observerte effekter av behandlingen. Toksisitet og terapeutisk virkningsfullhet av slike forbindelser kan bestemmes ved standard farmasøytiske prosedyrer *in vitro* (dvs. cellekulturer) eller *in vivo* (dvs., eksperimentelle dyremodeller), f.eks., for bestemmelse av LD₅₀ (dosen som er dødelig for 50% av populasjonen) og ED₅₀ (dosen som er terapeutisk effektiv i 50% av populasjonen). Doseforholdet mellom toksiske og terapeutiske effekter er den

terapeutiske indeksen (eller terapeutisk forhold), og kan uttrykkes som forholdet LD_{50}/ED_{50} . Konjugater som viser terapeutiske indekser på minst 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 og 20 er beskrevet heri. Konjugater som viser en stor terapeutisk indeks er foretrukne.

5

Data oppnådd fra *in vitro* analyser og dyrestudier kan for eksempel anvendes ved formulering av et område av doseringer for anvendelse i mennesker. Doseringen av slike forbindelser ligger fortrinnsvis innenfor et område av sirkulerende konsentrasjoner som omfatter ED_{50} med lav, liten eller ingen toksisitet. Doseringen kan variere innenfor dette området avhengig av den anvendte doseringsformen og administreringsmåten. For et hvilket som helst konjugat anvendt ved foreliggende oppfinnelse, kan den terapeutisk effektive dosen estimeres innledningsvis fra *in vitro* analyser. En dose kan formuleres i dyremodeller for å oppnå et sirkulerende plasmakonsentrasjonsområde som innbefatter IC_{50} (dvs. konsentrasjonen av testkonjugatet som oppnår en halvmaksimal inhibering av symptomer) som bestemt ved *in vitro* forsøk. Nivåer i plasma kan måles for eksempel ved høytytelsesvæskechromatografi eller ved en egnet enzymatisk aktivitetsanalyse. Effektene av en hvilken som helst spesiell dosering kan overvåkes ved en egnet bioanalyse av sluttpunkter.

10

15

20

Med mindre annet er angitt kan konjugater ifølge oppfinnelsen administreres ved en dose på omtrent fra 1 $\mu\text{g/kg}$ til 500 mg/kg , avhengig av graden av symptomene og utviklingen av sykdommen. Proteinholdige forbindelser kan for eksempel administreres ved langsom intravenøs infusjon i polyklinisk situasjon f.eks. ved administrasjon hver 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere dager eller f.eks. ukentlig, hver annen uke, hver måned eller hver annen måned. Den egnede terapeutisk effektive dosen av en forbindelse velges av den behandlende legen og vil variere omtrent fra 1 $\mu\text{g/kg}$ til 500 mg/kg , fra 1 $\mu\text{g/kg}$ til 10 mg/kg , fra 1 $\mu\text{g/kg}$ til 1 mg/kg , fra 10 $\mu\text{g/kg}$ til 1 mg/kg , fra 10 $\mu\text{g/kg}$ til 100 $\mu\text{g/kg}$, fra 100 μg til 1 mg/kg og fra 500 $\mu\text{g/kg}$ til 5 mg/kg .

25

30

Konjugater av α -galaktosidase A kan f.eks. administreres ved intravenøs infusjon ved en dose på f.eks. 1.0 mg/kg kroppsvekt hver annen uke ved en infusjonsrate på for eksempel mindre enn eller lik 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 eller 33 mg/time). I et annet eksempel kan konjugater av α -glukosidase administreres ved intravenøs injeksjon ved en dose på for eksempel 20 mg/kg eller 40 mg/kg hver annen uke

35

over omtrent for eksempel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller 10 timer. I noen tilfeller kan administrasjonsraten av α -glukosidase startes ved for eksempel 1 mg/kg/time og deretter økes ved for eksempel 2 mg/kg/time hver 30 minutter, etter å ha etablert pasienttoleranse overfor infusjonsraten, inntil et maksimum på for eksempel 7 mg/kg/time. Ytterligere eksempler på spesifikke doseringer kan finnes i *Physicians' Desk Reference*[®].

VI. Fremgangsmåter for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser

Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser, så som f.eks. de som er beskrevet i tabell 1. I noen utførelsesformer tilveiebringer oppfinnelsen et konjugat ifølge oppfinnelsen for anvendelse ved behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse i et objekt som har behov for dette. Oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåter for å målrette proteiner til lysosomet ved konjugering med oligosakkarider omfattende mannose-6-fosfat.

I en utførelsesform omfatter fremgangsmåten administrering til et pattedyr som har en lysosomal lagringsforstyrrelse av et oligosakkarid-glykoproteinkonjugat ifølge oppfinnelsen i en terapeutisk effektiv mengde. Oligosakkarid-glykoproteinkonjugatet kan være et konjugat av et lysosomalt enzym, så som et lysosomalt enzym angitt i tabell 1, med et oligosakkarid omfattende mannose-6-fosfat. I en utførelsesform omfatter fremgangsmåten administrering til et objekt som har behov for dette av en farmasøytisk sammensetning omfattende minst ett av konjugatene beskrevet heri.

I visse utførelsesformer kan konjugater ifølge oppfinnelsen administreres med en eller flere andre terapier. Den ene eller de flere andre terapiene kan administreres samtidig med (innbefattende samtidig administrering som en kombinert formulering), før eller etter administrering av konjugatene ifølge oppfinnelsen.

I noen utførelsesformer kan en pasient behandles (før, etter eller under behandling med et konjugat ifølge oppfinnelsen) med et antipyretisk middel, antihistaminmiddel og/eller et immunundertrykkende middel. I noen utførelsesformer kan en pasient behandles med et antipyretisk middel, et

antihistaminmiddel og/eller et immunundertrykkende middel før behandling med et oligosakkarid-glykoproteinkonjugat ifølge oppfinnelsen for å redusere eller forhindre infusjonsassosierte reaksjoner. For eksempel kan pasienter behandles med en eller flere av acetaminofen, azatioprin, cyklofosfamid, 5 cyklosporin A, metotrexat, mykofenolat mofetil, orale steroider eller rapamycin.

I noen utførelsesformer kan pasienter behandles med en eller flere av acetaminofen, azatioprin, cyklofosfamid, cyklosporin A, metotrexat, mykofenolat mofetil, orale steroider eller rapamycin ved eller omkring, for eksempel $t = 0$ 10 (tiden for administrering av konjugatet ifølge oppfinnelsen) og/eller $t = 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120$ og 144 timer for, f.eks. den første 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 eller flere forekomster av behandling med et konjugat ifølge oppfinnelsen. I noen utførelsesformer kan f.eks. en pasient med Fabry sykdom eller Pompe sykdom behandles med metotrexat (f.eks., med 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 15 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 mg/kg metotrexat, eller mer) ved eller omkring f.eks. $t = 0, 24$ og 48 timer i, f.eks., de første 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 uker av behandling med et konjugat ifølge oppfinnelsen. I noen utførelsesformer kan immuntoleranse mot konjugater ifølge oppfinnelsen induseres i en pasient med en lysosomal lagringsforstyrrelse så 20 som f.eks. mukopolysakkaridose I, ved behandling med cyklosporin A og azatioprin. For eksempel kan pasienten være behandlet med cyklosporin A og azatioprin som beskrevet i Kakkis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:829-834 (2004).

I noen utførelsesformer kan en pasient være behandlet (før, etter eller under behandling med et konjugat ifølge oppfinnelsen) med f.eks., småmolekylterapi og/eller genterapi rettet mot behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse. Småmolekylterapi kan omfatte administrering av en eller flere forbindelser beskrevet i f.eks., U.S. patentsøknad med publikasjonsnummer 2003/0050299, 30 2003/0153768; 2005/0222244; og 2005/0267094. Genterapi kan utføres som beskrevet i f.eks. U.S. patent nummer 5,952,516; 6,066,626; 6,071,890; og 6,287,857 og U.S. patentsøknad med publikasjonsnummer 2003/0087868.

Betegnelsene "behandling", "terapeutisk fremgangsmåte" og deres kognater 35 referer til både terapeutisk behandling og profylaktiske/forebyggende forholdsregler. Følgelig kan de som har behov for behandling innbefatte individer som allerede har en spesiell lysosomal lagringsforstyrrelse så vel som de som

står i fare for å få sykdommen (dvs. de som sannsynligvis etterhvert vil få sykdommen eller visse symptomer på sykdommen).

5 En terapeutisk metode resulterer i forebyggelse eller lettelse av symptomer eller et på annen måte ønsket biologisk resultat, og kan evalueres ved forbedrede kliniske tegn eller forsinket inntreden av sykdom, forøket aktivitet av det metabolisk defekte enzymet og/eller reduserte nivåer av det akkumulerte substratet av det metabolisk defekte enzymet.

10 Konjugatene ifølge foreliggende oppfinnelse er nyttige for å behandle forskjellige lysosomale lagringsforstyrrelser i mennesker og dyr. For eksempel kan administrering av konjugatene anvendes for å øke den manglende enzymatiske aktiviteten i en pasient med minst 10%. Den forøkede enzymatiske aktiviteten kan bestemmes ved f.eks. en reduksjon i kliniske symptomer eller ved en egnet
15 klinisk eller biologisk analyse.

GAA konjugater kan administreres for behandlingen av Pompe sykdom (også kjent som sur α -glukosidasemangel, sur maltasemangel, glykogenlagringsmangelsykdom type II, glykogenose II, og lysosomal α -glukosidasemangel). Forøket GAA aktivitet kan bestemmes ved biokjemiske (se, 20 f.eks. Zhu et al., J. Biol. Chem. 279: 50336-50341 (2004)) eller histologiske observasjoner av redusert lysosomal glykogenakkumulering i f.eks. hjertemyocytter, skjelettmyocytter, eller hudfibroblaster. GAA aktivitet kan også analyseres i for eksempel en muskelbiopsiprøve, i dyrkede hudfibroblaster, i 25 lymfocytter og i tørkede blodpunkter. Tørkede blodpunkter er beskrevet i for eksempel Umpathysivam et al., Clin. Chem. 47:1378-1383 (2001) og Li et al., Clin. Chem. 50:1785-1796 (2004). Behandling av Pompe sykdom kan også bedømmes ved f.eks. serumnivåer av kreatininkinase, økning i motorisk funksjon (f.eks., som bedømt ved Alberta Infant Motor Scale), endringer i 30 venstreventikulær masseindeks som målt ved ekkokardiogram og elektrisk aktivitet i hjertet, som målt ved elektrokardiogram. Administrering av GAA konjugater kan resultere i en reduksjon av ett eller flere symptomer på Pompe sykdom, så som kardiomegali, kardiomyopati, søvnighet på dagtid, åndenød ved utfoldelse, manglende trivsel, spisevanskeligheter, "kraftløshet", 35 bevegelsesanomaliteter, hodepine, hypotoni, organomegali (f.eks., forstørrelse av hjerte, tunge, lever), lordose, tap av balanse, smerte i korsryggen, morgenhodepine, muskelsvakhet, respiratorisk insuffisiens, scapula alata,

skoliose, reduserte dypsenereflekser, søvnapné, utsatthet for respiratoriske infeksjoner og oppkast.

5 Ifølge et annet trekk blir konjugater av α -galaktosidase A med oligosakkarider omfattende M6P administrert for behandlingen av Fabry sykdom. Fabry sykdom, eller Anderson-Fabry sykdom, er en sjelden X-forbundet, lysosomal lagringsforstyrrelse som markeres ved en mangel på α -galaktosidase A, og resulterer i akkumulering av globotriaosylceramid (GL3) og andre nøytrale glykosfingolipider i lysosomene av viskeralt vev og endoteliale, periteliale og muskelceller. Akkumulering av de nøytrale glykosfingolipidene i vaskulaturen resulterer i innsnevring og dilatering av blodkar, og fører endelig til iskemi og infarkt.

15 Administrering av α -galaktosidase A konjugater kan resultere i en reduksjon av ett eller flere kliniske symptomer på Fabry sykdom, innbefattende f.eks., akroparestesier, angina, angiokeratoma, arrytmier, ataksi av bevegelse, brennende og/eller prikkende smerte i hender og føtter, katarakter, kuldeintoleranse, ledningsanomaliteter, hornhinne verticillata, koronar arteriesykdom, demens, depresjon, diaré, dilaterte hjertekammere, svimmelhet, 20 kardiomegali, kardiomyopati, dobbeltsyn, dysartri, utmattelse, feber med forhøyet erytrocytt-sedimenteringsrate, hørselsproblemer, hjertesykdom, hjerteklaffproblemer, varmeintoleranse, hemitaksi, hemiparese, hypohidrose, forstyrret svetting, infarkt, iskemi, leddsmerte, nyresykdom, venstreventrikulær hypertrofi, lentikulære anormaliteter, lentikulær opasitet, lipiduri, 25 muskelsvakhet, myokardialt infarkt, kvalme, nystagmus, smerte (f.eks. intens smerte som stråler gjennom legemet), polydipsi, proteinuri, post-prandial smerte, nyresvikt, retinale anormaliteter, ringing i ørene; magesmerte, ST-T bølgeendringer, slag, uremi, klaffefeil, vertigo, oppkast og svakhet. Administrering av α -galaktosidase A konjugater kan resultere i forøket α -galaktosidase A aktivitet i f.eks. plasma, tårer, leukocytter, biopsivev eller dyrkede hudfibroblaster. Administrering av α -galaktosidase A konjugater kan også resultere i et histologisk funn av en reduksjon (f.eks. på minst 10%) eller mangel på økning av dobbeltbrytende lipidglobuler. Det kan også resultere i en reduksjon i lipidglobuler i urinsediment, forbedret nyrefunksjon som målt ved 30 serumkreatininnivåer eller kreatininclearance og redusert proteinuri. Administrering av α -galaktosidase A konjugater kan også resultere i en reduksjon i GL3 inklusjoner i det kapillære endotelium av nyre, hjerte og hud.

Ytterligere analyser for å måle virkningsfullheten av behandling for Fabry sykdom kan finnes i f.eks. MacDermott et al., J. Med. Genet. 38:750-760 (2001).

- 5 Ifølge nok et trekk administreres konjugater av sur sfingomyelinase for behandling av Niemann-Pick sykdom eller sur sfingomyelinasemangel. Administrering av sure sfingomyelinasekonjugater kan resultere i en reduksjon i ett eller flere kliniske symptomer på Niemann-Pick sykdom innbefattende f.eks., anormale kolesterolnivåer, anormale lipidnivåer, ataksi, blodanomaliteter,
- 10 kirsebærrøde punkter i øynene, hyppige lungeinfeksjoner, veksthemning, hepatosplenomegali, lavt plateantall, lymfadenopati, perifer neutropati, problemer med lungefunksjon, kortpustethet, hudpigmenteringsendringer eller xantom. I noen utførelsesformer kan konjugater administreres intrakranielt.
- 15 En alternativ utførelsesform vedrører behandling av mukopolysakkaridose I (innbefattende f.eks., Hurler og Hurler-Scheie former av MPS I) med konjugater omfattende α -L-iduronidase. Administrering av α -L-iduronidasekonjugater kan resultere i en reduksjon i ett eller flere kliniske symptomer på MPS I innbefattende, f.eks. aortisk tilbakestrømning, aortisk stenose, canalis
- 20 carpisyndrom, kronisk rhinitt, konduktivt hørselstap, konstipasjon, hornhinneslørning, utviklingsforsinkelse, diaré, utspent abdomen, dorsolumbar kyfose, gibbusdeformitet av ryggen, hepatosplenomegali, hydrocephalus, ingvinal brokk, kyfose, mental tilbakeståenhet, mitral tilbakestrømning, mitral stenose, nattblindhet, åpenvinklet glaukom, dårlig håndfunksjon, progressiv
- 25 artropati, tilbakevendende respiratoriske infeksjoner, respirasjonssvikt, retinadegenerering, skoliose, sensorineuralt hørselstap, alvorlig ryggsmerte, rhinoré, søvnapné, ryggmargskompresjon, tenar atrofi, umbilikalbrokk, og komplikasjoner i øvre luftveier.
- 30 Den foregående og den etterfølgende beskrivelsen er utelukkende ment som eksempelvis og forklarende, og er ikke ment å begrense oppfinnelsen som definert ved kravene.

35 **EKSEMPLER**

Eksempler 1-4 nedenfor beskriver synteseveien vist i FIG. 1. Forbindelser **1**, **2**, **3**, og **4**, som anvendt nedenfor, har de kjemiske strukturene angitt i FIG. 1.

Eksempel 1: Syntese av oligosakkarid 3

5

100 mg av oligosakkarid 1 (MW=1250; bisM6P-hydrazid, levert av Biomira Inc., Edmonton, Canada) ble oppløst i 15 ml av DMSO/H₂O (50:50 i volum), hvilket gir en 5,3 µmol/ml oppløsning. 100 mg t-Boc-aminooksy eddiksyretetrafluorfenylester **2** (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA; catalog # B3030) ble oppløst i 7,5 ml av DMSO. 15 ml av oligosakkaridoppløsningen ble deretter blandet med 7,5 ml av oppløsningen av **2** i en glassflaske, slik at det molare forholdet av forbindelse **2**:forbindelse **1** i den resulterende oppløsningen var 4:1. 744 µl DHBt-OH (fra et 32,06 mg/ml forråd i DMSO) ble tilsatt til reaksjonsblandingen i en glassflaske, slik at det endelige forholdet for forbindelse **2**:DHBt-OH er 1:0.5. Blandingen ble forsiktig ristet ved romtemperatur (25 °C) ved 100 OPM over natten i omkring 18 timer.

10

15

Den etterfølgende morgenen ble 10 µl av reaksjonsblandingen fjernet for Dionexanalyse for å bekrefte at reaksjonen var fullført. Resultatene, angitt i FIG. 2, indikerte 100% omdanning fra 1 til 3.

20

Eksempel 2: Rensing av oligosakkarid 3

Fremgangsmåte A. Reaksjonsblandingen ble fortynnet med et like stort volum av H₂O og dialysert i dialyserør med molekylvekt-cutoff på 1000 Dalton (SpectraPor Inc.) to ganger mot 4 L av H₂O ved 4 °C i minst 3 timer hver gang. Prøvene ble deretter lyofilisert.

25

Fremgangsmåte B. En Sephadex G-10 gelgjennomtrengningskromatografikolonne med et sjikt volum på 225 ml ble pakket og ekvilibrert med deionisert vann. Reaksjonsblandingen ble fylt på kolonnen, drenert ved hjelp av tyngdekraften og deretter eluert med deionisert vann ved en strømningsrate på 75 ml pr. time. 4,5 ml fraksjoner ble samlet med en fraksjonsamler. Fraksjoner 10-23, som inneholdt oligosakkarid 3, ble samlet, kombinert og lyofilisert. De andre små molekylene, innbefattende t-Boc-AOAA, DHBt-OH, og DMSO, eluerte i de senere fraksjonene og ble kastet.

30

35

Eksempel 3: Avbeskyttelse av oligosakkarid 3

5 t-Boc gruppen av den lyofilserte prøven ble avbeskyttet i 5 ml 50% trifluoreddiksyre (TFA) i diklormetan (DCM) i en glassflaske i 30 min med forsiktig risting ved 100 OPM. TFA/DCM ble deretter fjernet ved hjelp av en strøm av N₂ i en avtrekkshette.

Eksempel 4: Rensing av oligosakkarid 4

10

Fremgangsmåte A. Etter fjernelse av TFA/DCM, ble resten oppløst i 10 ml av 0,5 M natriumacetatbuffer, pH 5, og overført til dialyserør med en molekylvekt-cutoff på 1000 Dalton. Flasken ble vasket med 4 ml av den samme bufferen, som deretter ble overført til dialyserøret. Prøven ble dialysert to ganger mot 3 L av 25 mM natriumacetatbuffer, pH 7, i minst 3 timer, og deretter overført til 4 L iskald H₂O for dialyse over natten. Prøven ble utvunnet fra dialyserøret og lyofilisert.

15

20

Fremgangsmåte B. Etter fjernelse av TFA/DCM, ble resten oppløst i 5 ml av 0,5 M natriumacetatbuffer, pH 7,5, og belagt på en Sephadex G-10 gelgjennomtrengningskromatografikolonne som i eksempel 2, fremgangsmåte B. Reaksjonsblandingen ble belagt på kolonnen, drenert ved hjelp av tyngdekraften, og deretter eluert med deionisert vann ved en strømningsrate på 75 ml pr time. 4,5 fraksjoner ble samlet ved en fraksjonsamler. Fraksjoner 10-23, som inneholdt rensset oligosakkarid **4**, ble samlet og lyofilisert. Et høyere utbytte av oligosakkarid **4** ble oppnådd ved rensing ved fremgangsmåte B enn ved fremgangsmåte A.

25

30

Sluttproduktet oppnådd fra fremgangsmåte B ble analysert ved Dionex kromatografi (FIG. 2C), og identiteten av produktet ble bekreftet ved massespektrometri (FIG. 3B). Noen forurensninger var til stede i spektra av FIG. 2C og FIG. 3B.

Eksempel 5: Kopling av oligosakkarid 4 til GAA

Oksidasjon av GAA. Lyofilisert rekombinant humant GAA (rhGAA) ble rekonstituert i H₂O og dialysert mot 4 L av 100 mM acetatbuffer (pH 5,6) 4 ganger for fullstendig å fjerne mannitol. Etter dialyse ble rhGAA oksidert med 7,5 mM natriumperiodat fra 100 mM forrâdsløsning i 100 mM acetatbuffer. Etter 30 minutter ved 4 °C på is ble glycerol tilsatt, og prøven ble blandet på is i 10 minutter for å dekomponere overskudd natriumperiodat. Det oksiderte materialet ble deretter dialysert mot vandig buffer (f.eks. 100 mM natriumacetat) over natten.

Kopling. En oppløsning av oligosakkarid **4** i vandig buffer (f.eks. 100 mM natriumacetat, pH 5,6) ble blandet med oksidert GAA og inkubert ved 37 °C i 4 timer for å gi oligosakkarid-GAA konjugat **5**. Reaksjonsblandingen ble deretter diafiltrert mot 25 mM natriumfosfatbuffer, pH 6,25, for å fjerne ukonjugert bisM6P glykan, og deretter justert med GAA formuleringsbuffer (25 mM natriumfosfatbuffer, pH 6,25, 2% mannitol, 0,005% Tween-80).

Eksempel 6: Karakterisering av GAA konjugat

Deteksjon av M6P. Omfanget av oligosakkaridkonjugering ble målt ved å analysere konjugat **5** for binding til en M6P reseptorkolonne hvortil glykoproteiner som mangler M6P ikke binder. Fem mikrogram konjugat **5** ble belagt på en forekvilibrert CI-MPR-Sepharosekolonne (kolonnen ble preparert ved kopling av CI-MPR isolert fra føtalt bovint serum til Affigel-10), som deretter ble vasket med CI-MPR bindende buffer for 11x 2 mL fraksjoner og eluert med CI-MPR bindende buffer inneholdende 5 mM M6P for 7x 2mL fraksjoner. Totalt 18 fraksjoner ble samlet og analysert for enzymatisk aktivitet.

Monosakkaridanalyse. Konjugat **5** behandles med 4N trifluoreddiksyre for å hydrolysere oligosakkaridene, etterfulgt av anionbytterkromatografi ved høy pH med pulset amperometrisk deteksjon (PAD) på et BioLC væskechromatografisystem (Dionex). Monosakkaridinnholdet ekstrapoleres fra en monosakkaridstandardkurve ved å anvende forblandede monosakkaridstandarder (Dionex).

Spesifikk aktivitet. GAA aktivitet måles ved å anvende en fluorometrisk analyse i sorte 96-brønns mikroplater ved anvendelse av 4-metyllumbelliferyl- α -D-glukosid

som et substrat. Fortynninger av konjugat 5 tilsettes i triplikat til en mikrotiterplate. 4-metyllumbelliferyl- α -D-glukosid tilsettes til hver prøve. 96-brønnsplaten inkuberes i en 37 °C inkubator i 30 minutter. Frigivelsen av produkt detekteres fluorometrisk, og sammenlignes med standardkurver generert ved å måle fluorescensen av en kjent mengde av en standard. Reaksjonen stoppes ved tilsetningen av 125 μ L av 1,0 M glycin-karbonatbuffer, pH 10,5 til alle brønner. Den spesifikke aktiviteten defineres som nmol produkt frigitt /time/mg.

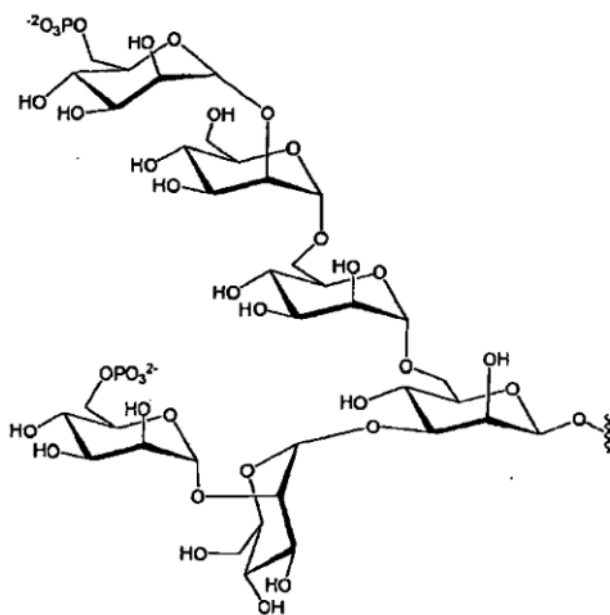
Internalisering ved L6 Myoblaster. Celler (ATCC CRL-1458) ble sådd i 6-brønnsplater ved $5,0 \times 10^5$ celler/brønn i vekstmedium (DMEM + 10% FBS) og dyrket til konfluens. Celler ble inkubert med 0-100 nM GAA (konjugat 5 eller ukonjugert rhGAA) i 16 timer i DMEM + 1% varmeinaktivert -FBS + 10 mM Hepes pH 6,7. Etter opptak ble cellene vasket med 3x PBS inneholdende 5 mM M6P og lysert med 0,25% Triton X-100 i 1 time på is. Lysater ble sentrifugert ved 18000g i 5 minutter og testet for spesifikk aktivitet. e, f.eks. Zhu et al., J. Biol. Chem. 279:50336-50341 (2004); Zhu et al., Biochem. J. 389:619-628 (2005).

Alle referanser som er sitert heri er innbefattet som henvisning heri i sin helhet. I den grad publikasjoner og patenter eller patentsøknader som er inkorporert som henvisning motsier oppfinnelsen inneholdt i beskrivelsen er beskrivelsen ment å gå forut for og/eller ha presedens overfor ethvert slikt motsigende materiale.

Alle tall som uttrykker mengder av bestanddeler, reaksjonsbetingelser, og så videre, anvendt i beskrivelsen og kravene skal forstås som i ethvert tilfelle modifisert ved betegnelsen "omkring". Følgelig er, med mindre annet er angitt, de numeriske parametrene angitt i beskrivelsen og kravene tilnærmelser som kan variere avhengig av de ønskede egenskapene som søkes oppnådd ved foreliggende oppfinnelse. I det minste, og ikke som et forsøk på å begrense anvendeligheten av ekvivalensdoktrinen på kravomfanget, bør hver numerisk parameter ses i lys av antallet signifikante siffer og vanlige avrundingsregler.

Patentkrav

1. Oligosakkarid-lysosomalt enzymkonjugat, omfattende (1) et lysosomalt enzym, (2) et oligosakkarid, og (3) en oksimgruppe som forbinder det lysosomale enzymet og oligosakkaridet, hvor oligosakkaridet er et oligosakkarid av formel VI:



Formel **VI**

2. Oligosakkarid-proteinkonjugat ifølge krav 1, hvor det lysosomale enzymet er sur α -glukosidase, α -galaktosidase A, sur sfingomyelinase, eller α -L-iduronidase.

3. Oligosakkarid-proteinkonjugat ifølge krav 2, hvor det lysosomale enzymet er sur α -glukosidase.

4. Farmasøytisk sammensetning, omfattende det oligosakkarid-lysosomale enzymkonjugatet ifølge krav 1 og et hjelpestoff.

5. Konjugat ifølge krav 1, for anvendelse ved behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse i et objekt som har behov for dette.

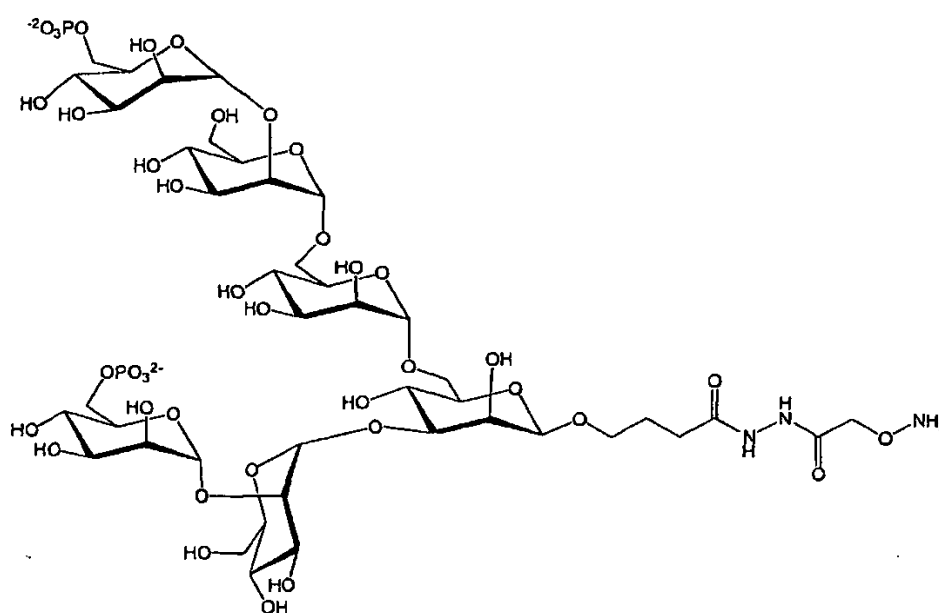
6. Anvendelse av et konjugat ifølge krav 1 ved fremstillingen av et medikament for behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

7. Fremgangsmåte for fremstilling av et konjugat ifølge krav 1 ved kopling av et oligosakkarid til et lysosomalt enzym, omfattende:

- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe;
 (b) tilveiebringelse av et lysosomalt enzym som har minst en karbonylgruppe;
 og

(c) omsetning av aminoksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av det lysosomale enzymet,

for derved å koble oligosakkaridet til det lysosomale enzymet, hvor oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe er

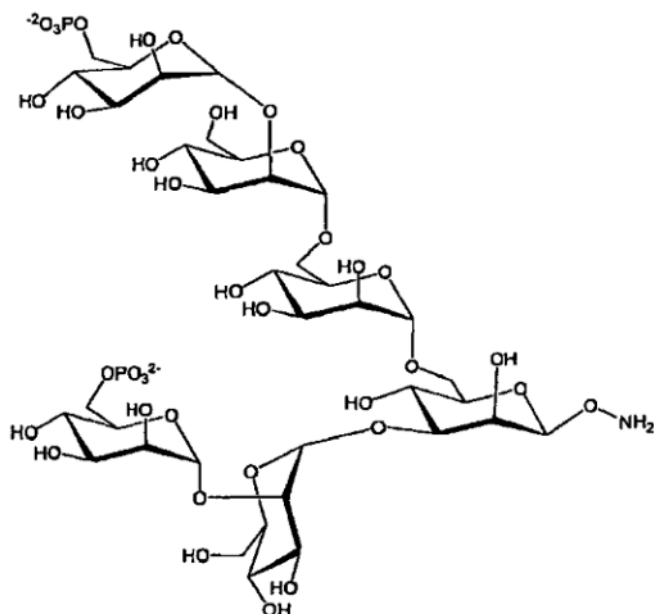


8. Fremgangsmåte for fremstilling av et konjugat ifølge krav 1 ved kopling av et oligosakkarid til et lysosomalt enzym, omfattende:

- (a) tilveiebringelse av et oligosakkarid omfattende en aminoksygruppe;
 (b) tilveiebringelse av et lysosomalt enzym som har minst en karbonylgruppe;
 og

(c) omsetning av aminoksygruppen av oligosakkaridet med den minst ene karbonylgruppen av det lysosomale enzymet,

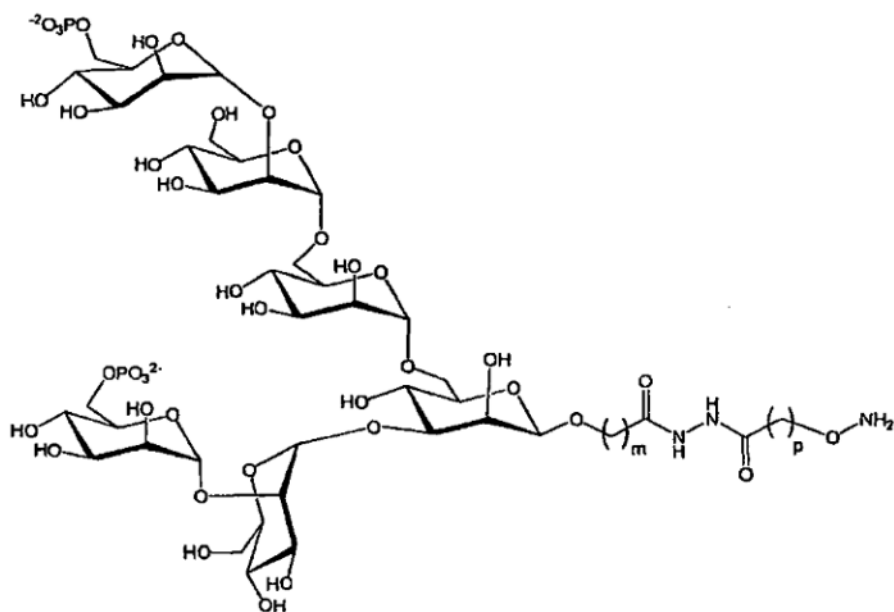
for derved å koble oligosakkaridet til det lysosomale enzymet, hvor oligosakkaridet omfattende en aminoksygruppe er



5 **9.** Fremgangsmåte ifølge krav 7, hvor det lysosomale enzymet er sur α -glukosidase, α -galaktosidase A, sur sfingomyelinase, eller α -L-iduronidase.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, hvor det lysosomale enzymet er sur α -glukosidase.

10 **11.** Oligosakkarid av formel IV:



Formel **IV**

hvor m og p uavhengig er valgt fra heltall varierende fra 1 til 10.

12. Oligosakkarid ifølge krav 11, hvor m er 3.

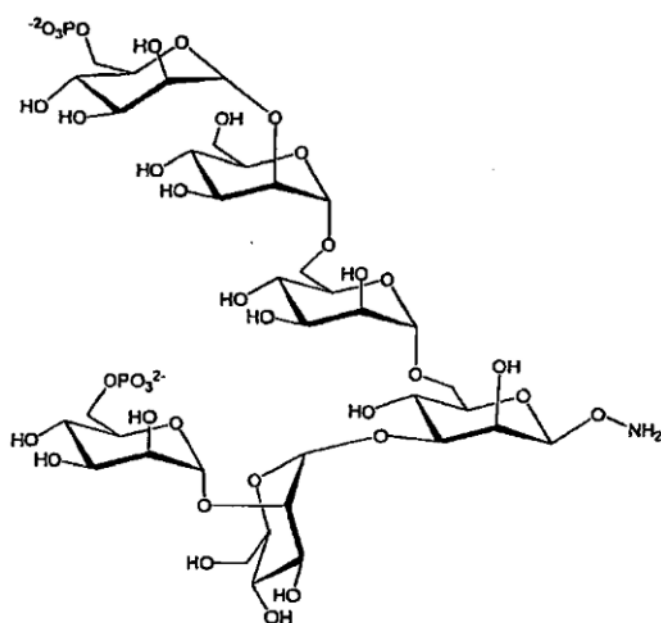
5

13. Oligosakkarid ifølge krav 11, hvor p er 1.

14. Oligosakkarid ifølge krav 11, hvor m er 3 og p er 1.

10

15. Oligosakkarid av formel **V**:



Formel **V**

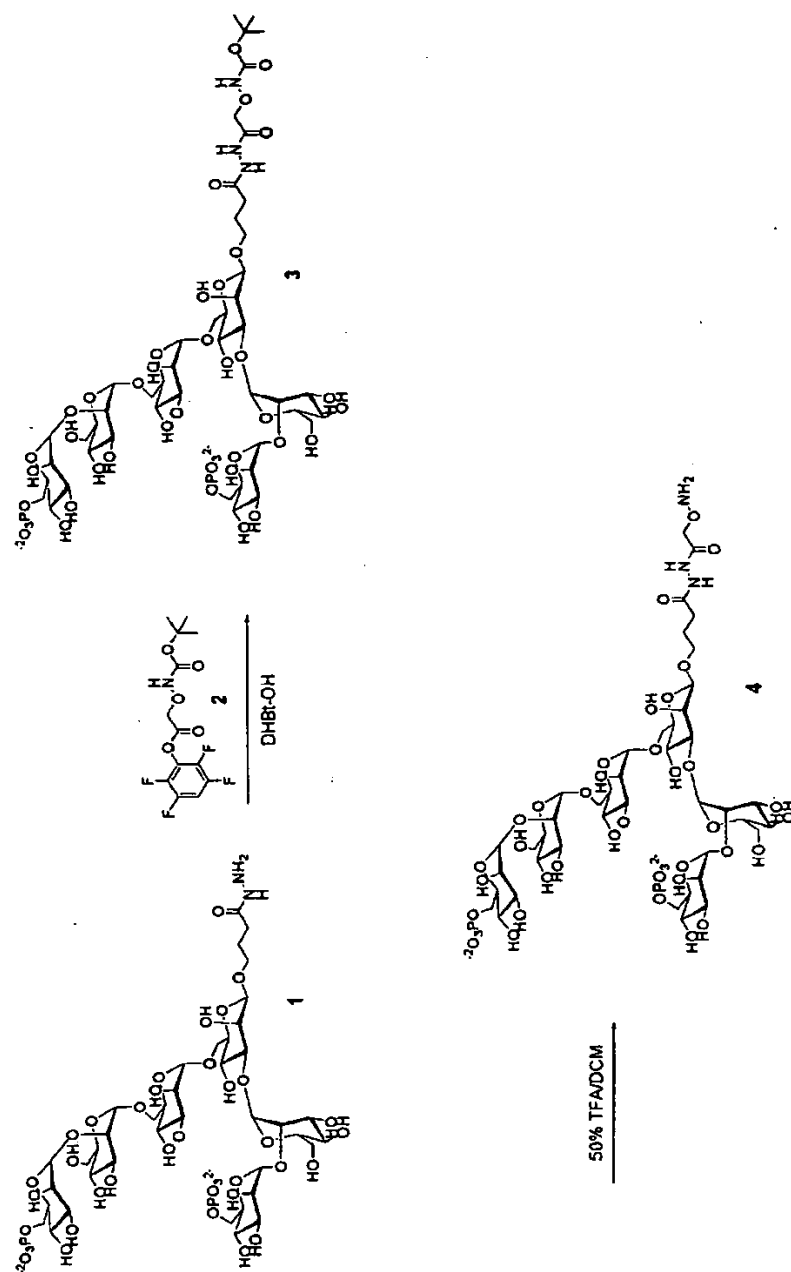


FIG. 1

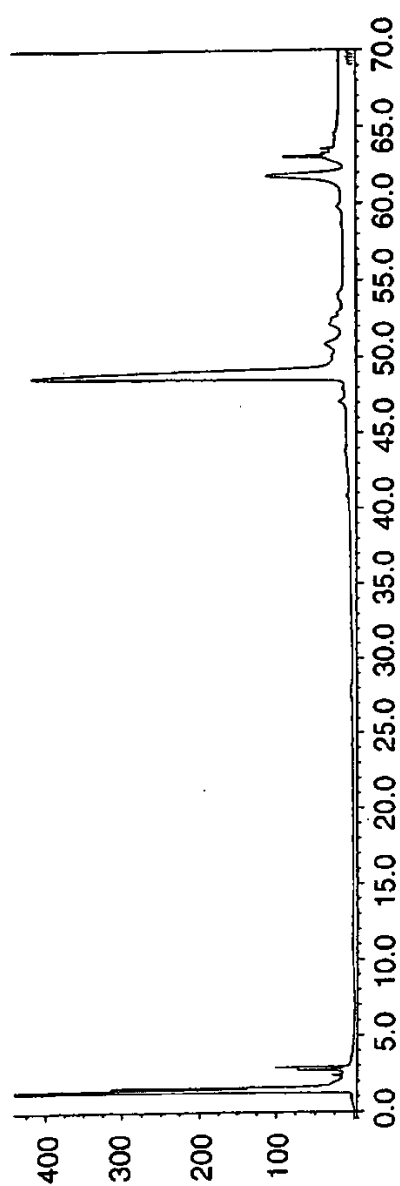


FIG. 2A

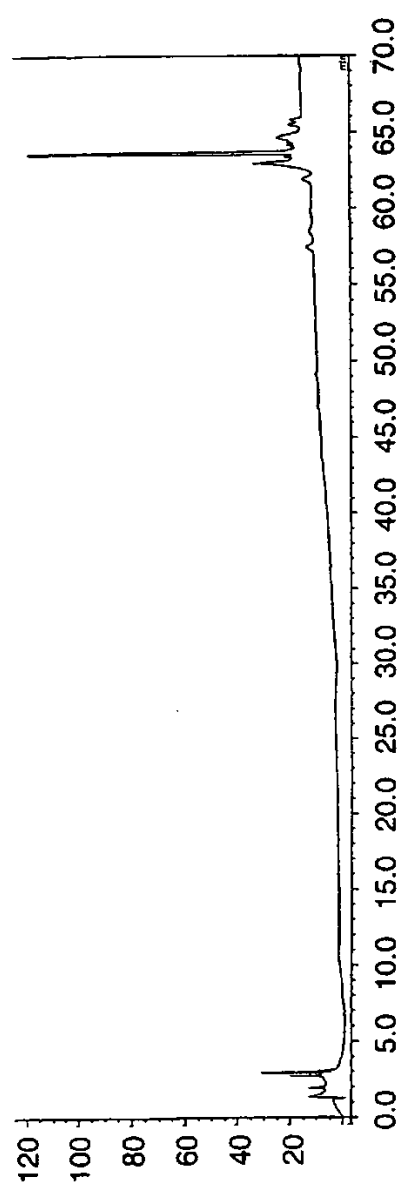


FIG. 2B

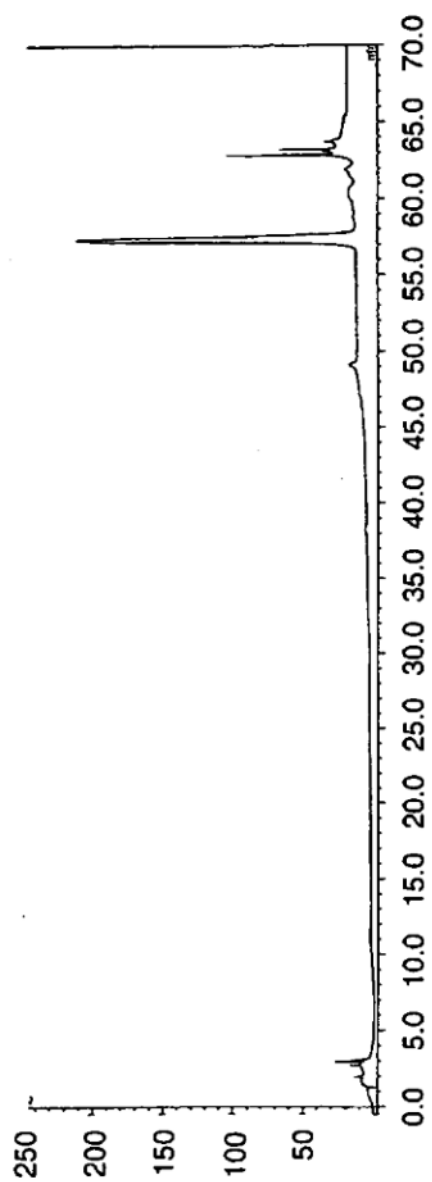


FIG. 2C

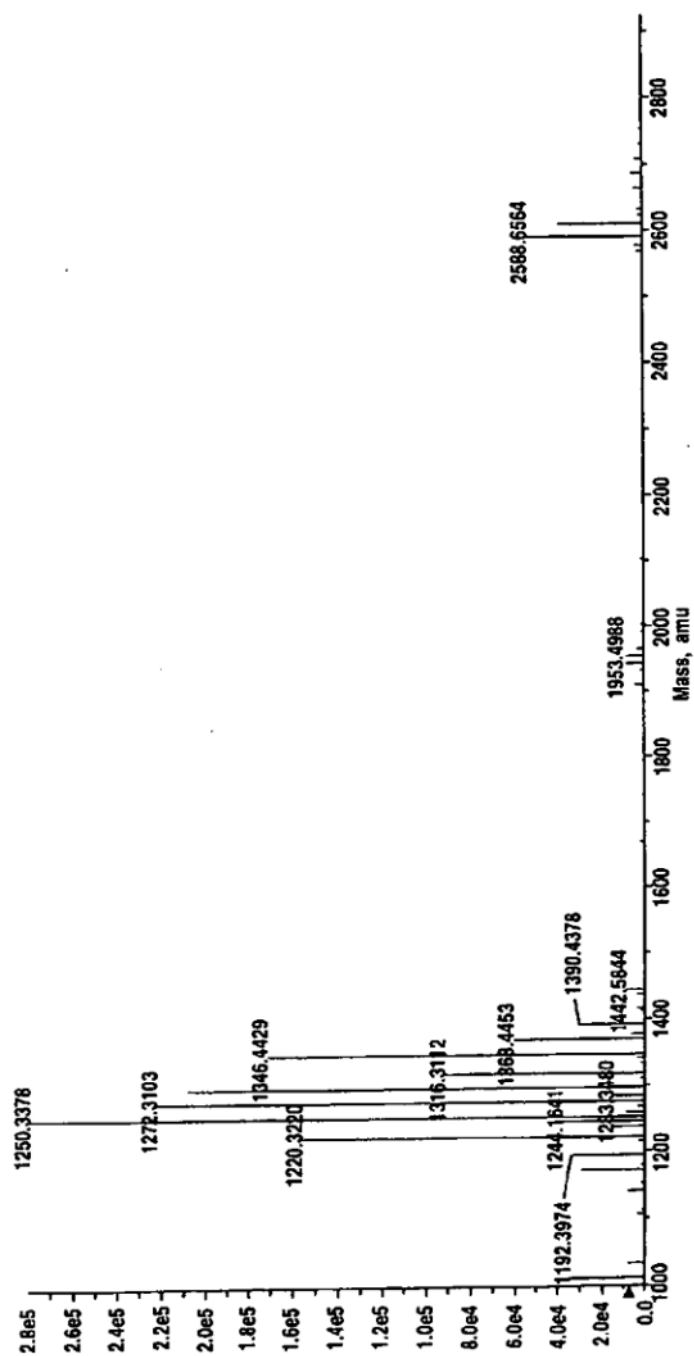


FIG. 3A

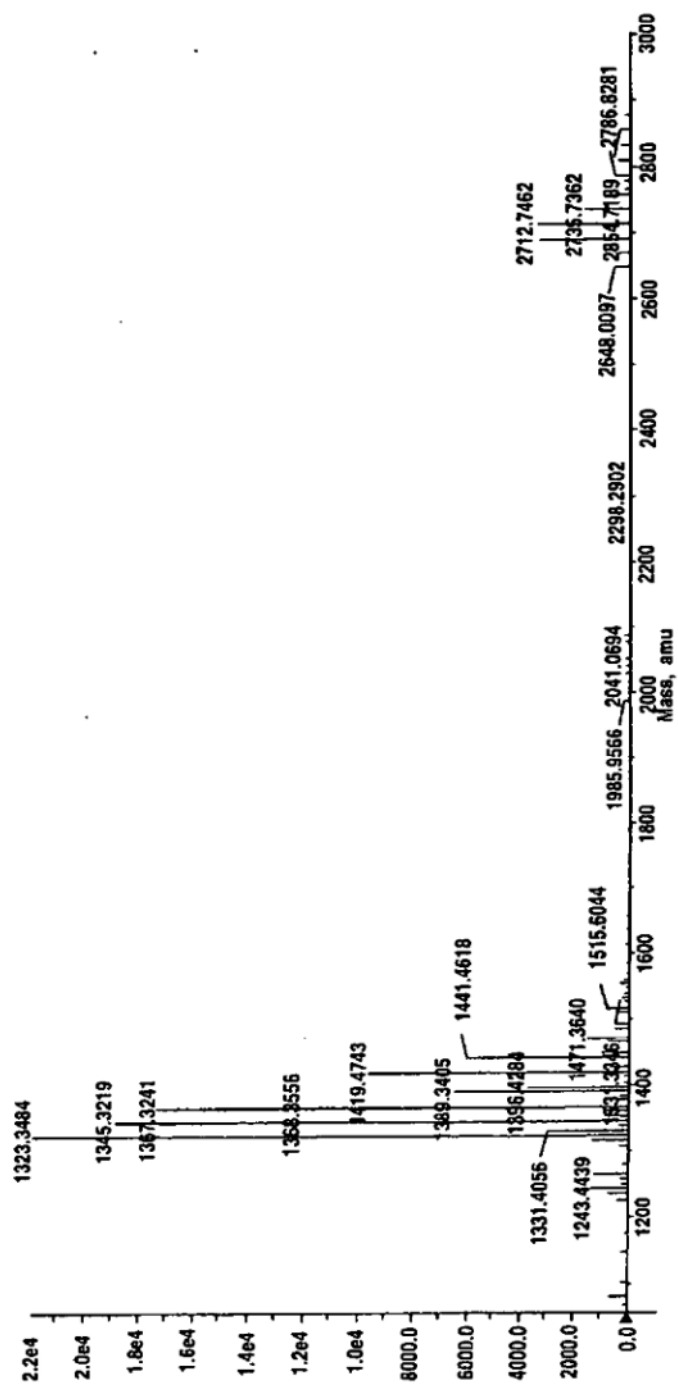


FIG. 3B

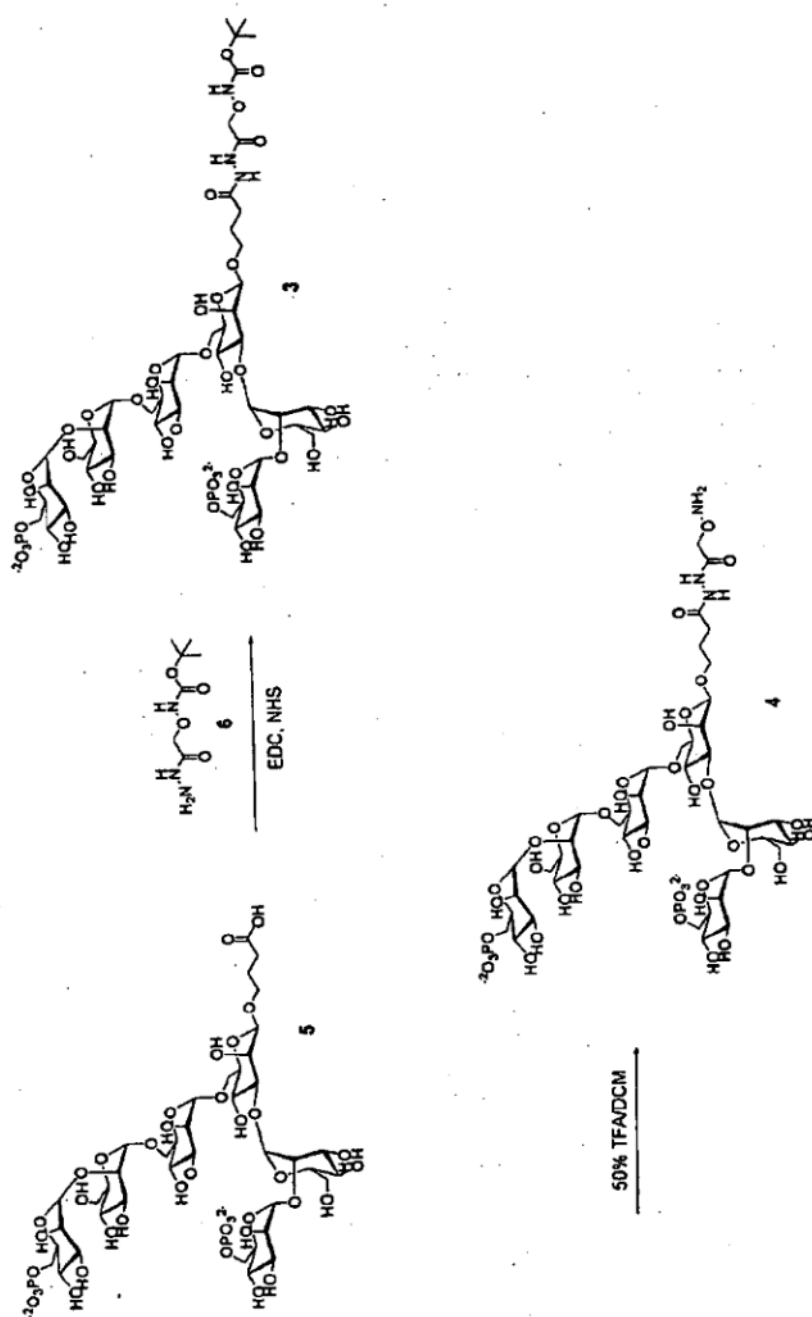


FIG. 4