



등록특허 10-2833376



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월11일

(11) 등록번호 10-2833376

(24) 등록일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *A01K 67/027* (2024.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*A01K 67/0276* (2024.01)  
(21) 출원번호 10-2018-7019970  
(22) 출원일자(국제) 2016년12월14일  
심사청구일자 2021년12월13일  
(85) 번역문제출일자 2018년07월12일  
(65) 공개번호 10-2018-0098294  
(43) 공개일자 2018년09월03일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/066611  
(87) 국제공개번호 WO 2017/106313  
국제공개일자 2017년06월22일  
(30) 우선권주장  
62/267,502 2015년12월15일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
J. Inherit. Metab. Dis., Vol.38, No.S1,  
pp.S245(2015.08.04.)  
WO2015060722 A1\*  
WO2015168666 A2  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
**젠자임 코포레이션**  
미국 메사추세츠주 02141 캠프리지 워터 스트리트 450  
**사회복지법인 삼성생명공익재단**  
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)  
(72) 발명자  
**유, 넬슨**  
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55 사노피 내  
**진, 동-규**  
대한민국 서울특별시 용산구 이태원로 55길 48 사회복지법인 삼성생명공익재단 내  
(74) 대리인  
**양영준**

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 전명숙

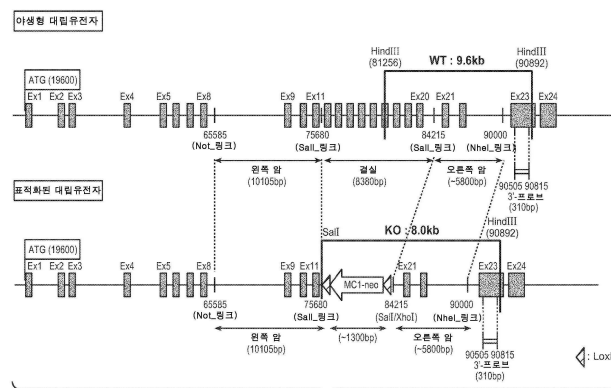
(54) 발명의 명칭 **류코지질증 II형을 치료하기 위한 아데노-관련 바이러스 벡터**

## (57) 요약

N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 알파 및 베타 서브유닛(GNPTAB)을 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 rAAV 입자 내에 포함될 수 있고, 이는 약학적 조성물 및 키트 내에 함유될 수 있다.

(뒷면에 계속)

## 대표도



이들 벡터, 입자, 조성물, 및 키트는, 그 중에서도, 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 II I형(ML III)을 치료하는 것과 관련되거나, 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유 동물에서 신체 크기, 골 무기질 함량, 및/또는 골 무기질 밀도를 증가시키는 것과 관련된 방법 및 용도에서 유용성을 발견할 수 있다.

(52) CPC특허분류

**A61K 48/005** (2013.01)

**C12N 9/1288** (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0306 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2830/15 (2013.01)

C12N 2830/50 (2013.01)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 2개의 AAV 역위 말단 반복부들(ITRs)을 포함하는 벡터; 및

(b) AAV8 캡시드

를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 입자이며, 여기서 벡터는 단축된 CMV 인핸서 및 절단된 닭 베타-액틴(CBA) 프로모터를 포함하는 것인, rAAV 입자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

GNPTAB은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함하고, 벡터는 단일 가닥의 rAAV 벡터인, rAAV 입자.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 벡터는:

(a) 인트론; 및

(b) 폴리아데닐화 서열

을 포함하는 것인, rAAV 입자.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 인트론은 MVM 인트론인, rAAV 입자.

#### 청구항 5

포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 치료는 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 또는 이의 진행을 지연시키고, ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사인, 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제5항에 있어서, 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서 신체 크기, 골 무기질 함량 또는 골 무기질 밀도를 유지하거나, 이의 감소를 예방하거나 또는 이를 증가시키는 데 사용하기 위한 약학적 조성물이며, 여기서 rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 2개의 AAV ITRs을 포함하고, GNPTAB의 발현은 체중의 유지, 감소의 예방, 또는 증가; 신장 증가 폭의 유지 또는 증가; 및/또는 골 무기질 함량 또는 밀도의 유지, 감소의 예방 또는 증가를 야기하는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서, 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 또는 이의 진행을 지연시키는 데 사용하기 위한 약학적 조성물이며, 여기서 rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 2개의 AAV ITRs을 포함하고; ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결

뿔, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성  
점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사인, 약학적 조성물.

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

삭제

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88



삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2015년 12월 15일에 출원된 U.S. 가출원 번호 제 62/267,502호의 우선권 이익을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로서 포함된다.
- [0003] ASCII 텍스트 파일로의 서열 목록 제출
- [0004] ASCII 텍스트 파일로의 다음 제출 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능 형태(CRF)(파일명: 159792012640SEQLIST.txt, 기록일: 2016년 12월 9일, 크기: 21 KB).
- [0005] 발명의 기술분야
- [0006] 본 발명은 뮤코지질증 II형 및/또는 III형을 치료하기 위한 rAAV 벡터, 입자, 조성물뿐만 아니라 그에 관련된 방법, 키트 및 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0007] 뮤코지질증 II형 및 III형(ML II; ML III)은 UDP-GlcNAc;리소좀 효소 N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제(GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제로 축약됨)의 결핍을 특징으로 하는 상염색체 열성 리소좀축적질환이다. GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제는 세 개의 상이한 서브유닛:  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ , 및  $\gamma_2$ 로 구성된 육합체 효소 복합체이다.  $\alpha_2$ , 및  $\beta_2$ , 서브유닛은 촉매 활성을 함유하고, 단일 유전자, GNPTAB에 의해 인코딩된다. 효소 활성의 완전 결실을 야기하는 GNPTAB에서의 돌연변이는 MLII 환자들에서 발견된다. 뮤코지질증 II는 고도로 진행성이며, 환자들은 거의 10살을 넘어서 생존하지 못한다. 추가적으로, ML II에 대한 이용 가능한 치료 선택권은 여전히 제한적이다. 단지 골수 이식만이 소수의 환자에서 시도되어왔다. 대조적으로, GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제 활성의 부분적 감소를 야기하는 GNPTAB에서의 돌연변이는 ML III 환자들에서 발견된다. 이들 환자는 일반적으로 덜 심각한 증상 및 더 느린 질환 진행을 나타내지만 여전히 골격 이상, 발달 지연, 및 심장 비대와 같은 심각한 건강 문제를 나타낸다.
- [0008] 조직 특이적 굴성을 나타내고 전이유전자(transgene)의 지속 발현을 촉진하는 AAV 혈청형의 이용 가능성은 ML II 및 ML III를 포함하는, 리소좀 질환의 전신 치료를 위한 AAV-매개 유전자 치료의 가능성을 제공한다. 따라서, ML II/III의 AAV-매개 치료에 대한 조사는 이 접근이 이런 엄청난 손상을 가하는 질환에 대한 잠재적인 치료 전략에 해당하는지 여부를 확립하기 위하여 중요하다. 그러나, ML II/III의 AAV-매개 치료가 검토될 수 있기 전에, 기술적 한계가 극복될 필요가 있다. GNPTAB의 코딩 서열(인간에서는 5.6 kb 이상)은 내인성 AAV 게놈(약 4.7 kb)보다 길다. 따라서, 바이러스 입자 내로의 효율적인 패키징을 여전히 가능하게 하면서 기능적 프로모터/인핸서 서열 및 AAV 게놈의 다른 성분들과 함께 GNPTAB을 수용할 수 있는 AAV 벡터는 대단히 유리하다.

## 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는 제조함 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 제공한다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 알파 및 베타 서브유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 인간 GNPTAB이다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CMV 인핸서/답 베타-액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, CBA 프로모터는 변형된 CBA 프로모터이다. 일부 구현예에서, 변형된

CBA 프로모터는 절단된 CBA 프로모터이다. 일부 구현예에서, CMV 인핸서는 단축된 CMV 인핸서이다. 일부 구현예에서, 벡터는 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 MVM 인트론이다. 일부 구현예에서, 벡터는 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열이다. 일부 구현예에서, AAV 말단 반복부는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 2개의 ITR을 포함한다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 일부 양태에서, 본 발명은 상기 구현예 중 어느 하나의 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV 입자를 제공한다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2 R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV, 또는 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 동일한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 바이러스 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV8 캡시드를 포함하며, 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산 및 AAV rep 및 cap 기능을 인코딩하는 핵산으로 숙주세포를 형질감염시키고, AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 제공하는 것에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산으로 숙주세포를 형질감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 제공하는 AAV 헬퍼 바이러스로 숙주세포를 감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 배칼로바이러스이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산 및 AAV rep 및 cap 기능을 인코딩하는 핵산을 포함하며, AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 제공하는 AAV 생산체 세포에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, AAV 생산체 세포는 AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 제공하는 AAV 헬퍼 바이러스로 AAV 생산체 세포를 감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 또는 배칼로바이러스이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자 또는 본원에 기재된 약학적 조성물의 유효량을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 뮤코지질증 II 형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0012] 일부 양태에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료하기 위한 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하며, rAAV 벡터는 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서 신체 크기를 유지 또는 증가시키는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 체중 증가 폭의 유지 또는 증가, 및/또는 신장 증가 폭의 유지 또는 증가를 야기하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 신체 크기의 감소를 예방하는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB)를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 체중 감소를 예방하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 골 무기질 함량을 유지 또는 증가시키는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 골 무기질 함량의 유지 또는 증가를 야기하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 골 무기질 함량의 감소를 예방하는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 골 무기질 함량의 감소를 예방하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지

질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 골 무기질 밀도를 유지 또는 증가시키는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 골 무기질 밀도의 유지 또는 증가를 야기하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 골 무기질 밀도의 감소를 예방하는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하고, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하며, GNPTAB의 발현이 골 무기질 밀도의 감소를 예방하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0013] 상기 방법의 일부 구현예에서, 치료는 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키며, ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사이다. 일부 구현예에서, 치료는 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하며, ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하며, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하는 방법을 제공한다; ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하며, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하는 방법을 제공한다; ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모관막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사이다.

[0014] 상기 방법의 일부 구현예에서, GNPTAB는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 인간 GNPTAB이다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 CMV 인핸서/답 베타-액틴(CBA) 프로모터이다. 일부 구현예에서, CBA 프로모터는 변형된 CBA 프로모터이다. 일부 구현예에서, 변형된 CBA 프로모터는 절단된 CBA 프로모터이다. 일부 구현예에서, CMV 인핸서는 단축된 CMV 인핸서이다. 일부 구현예에서, 벡터는 인트론을 포함한다. 일부 구현예에서, 인트론은 MVM 인트론이다. 일부 구현예에서, 벡터는 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리아데닐화 서열은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열이다. 일부 구현예에서, AAV 말단 반복부는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 2개의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV, 또는 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 동일한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 바이러스 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV8 캡시드를 포함하며, 벡터는 AAV2 ITR을 포함한다.

[0015] 상기 구현예의 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산 및 AAV rep 및 cap 기능을 인코딩하는 핵산으로 숙주세포를 형질감염시키고, AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 제공하는 것에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산으로 숙주세포를 형질감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 제공하는 AAV 헬퍼 바이러스로 숙주세포를 감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 배칼로바이러스이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산 및 AAV rep 및 cap 기능을 인코딩하는 핵산을 포함하며, AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 제공하는 AAV 생산체 세포에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, AAV 생산체 세포는 AAV 헬퍼 기능을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 헬퍼 기능을 제공하는 AAV 헬퍼 바이러스로 AAV 생산체 세포를 감염시키는 것에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 또는 배칼로바이러스

스이다.

- [0016] 상기 방법의 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다. 일부 구현예에서, 인간은 소아 대상체이다. 일부 구현예에서, 인간은 청년이다.
- [0017] 상기 방법의 일부 구현예에서, rAAV는 정맥내, 복강내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 간내 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV는 정맥내 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV는 하나를 초과하는 위치에 투여된다. 일부 구현예에서, 투여는 반복된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자는 약학적 조성물 내에 있다. 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.
- [0018] 일부 양태에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III을 치료하기 위한 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III을 치료하기 위한 본원에 기재된 임의의 재조합 AAV의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 방법에서 사용하기 위한 본원에 기재된 임의의 재조합 AAV의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하기 위한 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상을 완화시키거나 포유동물에서 ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상의 진행을 지연하기 위한 본원에 기재된 임의의 재조합 AAV의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, ML II 또는 ML III의 하나 이상의 증상은 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모판막 비대 및 기능 부전, 변비 또는 설사이다. 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0019] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 rAAV 벡터, 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자 또는 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 일부 구현예에 있어서, 키트는 본원에 기재된 임의의 방법에 따라서 ML II 또는 ML III을 치료하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 키트는 본원에 기재된 임의의 rAAV 벡터, 본원에 기재된 임의의 rAAV 입자 또는 본원에 기재된 임의의 약학적 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 하나 이상의 완충제 또는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 ML II 및/또는 ML III의 치료에 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.
- [0020] 일부 양태에서, 본 발명은 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(GNPTAB) 유전자의 적어도 하나의 대립유전자가 엑손 12와 엑손 20 사이에 위치한 결실을 포함하는 뮤코지질증 II(ML II)의 동물모델을 제공한다. 일부 구현예에서, GNPTAB 유전자의 적어도 하나의 대립유전자는 엑손 12와 엑손 20에 걸친 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 동물은 GNPTAB 유전자 내의 결실에 대하여 동형접합이다. 일부 구현예에서, 동물은 GNPTAB 유전자 내의 결실에 대하여 이형접합이다. 일부 구현예에서, GNPTAB 유전자의 일부분이 리포터 및/또는 선택 마커를 인코딩하는 유전자에 의해 대체된다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 네오마이신에 대한 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서 포유동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 설치류는 마우스이다. 일부 구현예에서, 마우스는 129/Sv 및/또는 C57B1/6에서 유래된 유전적 배경을 가진다. 일부 구현예에서, 동물은 면역적격 또는 면역결핍이다.
- [0021] 일부 양태에서, 본 발명은 동물 상의 GNPTAB 유전자의 적어도 하나의 대립유전자 내에 엑손 12와 엑손 20 사이의 결실을 도입하는 것을 포함하는 뮤코지질증 II(ML II)의 동물모델을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, GNPTAB 유전자의 적어도 하나의 대립유전자는 엑손 12와 엑손 20에 걸친 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 동물은 GNPTAB 유전자 내의 결실에 대하여 동형접합이 되도록 사육된다. 일부 구현예에서, 동물은 GNPTAB



유전자 내의 결실에 대하여 이형접합이 되도록 사육된다. 일부 구현예에서, GNPTAB 유전자의 일부분이 리포터 및/또는 선택 마커를 인코딩하는 유전자에 의해 대체된다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 네오마이신에 대한 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 동물은 포유동물이다. 일부 구현예에서 포유동물은 설치류이다. 일부 구현예에서, 설치류는 마우스이다. 일부 구현예에서, 마우스는 129/Sv 및/또는 C57B1/6에서 유래된 유전적 배경을 가진다. 일부 구현예에서, 동물은 면역적격 또는 면역결핍이다.

[0022] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 동물 모델에 제제를 투여하는 것을 포함하는 뮤코지질증 II(ML II)의 치료를 위한 제제를 평가하는 방법으로서, ML II의 하나 이상의 증상의 완화는 제제가 ML II의 유익한 치료를 제공할 수 있다는 것을 나타내는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, ML II의 증상은 체중 감소, 골밀도 감소, 골 무기질 함량 감소, 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모판막 비대 및 기능 부전, 변비 및/또는 설사이다. 일부 구현예에서, 제제는 저분자, 폴리펩티드, 항체, 핵산 또는 재조합 바이러스 입자이다.

[0023] 특허 출원 및 공개를 포함하는 본원에서 인용되는 모든 참고문헌은 이의 전문이 참조로 편입된다.

### 도면의 간단한 설명

[0024] 도 1a는 마우스 GNPTAB 유전자 구조 및 GNPTAB 녹아웃 마우스를 생성하기 위하여 사용된 유전자 트랩(gene trapping) 벡터의 게놈 삽입 부위의 도해를 제공한다.

도 1b는 GNPTAB 녹아웃 마우스를 생성하기 위해 사용된 마우스 ES 클론을 보여주는 서던 블롯이다.

도 2a 내지 도 2c는 GNPTAB 녹아웃 마우스에 존재하는 성장 지체를 보여준다. (도 2a) 6 주령의 야생형(+/+), 이형접합체(+/-) 및 동형접합체(-/-) 마우스의 체중(g)(\*\*\*;  $p < 0.0001$ ; Bonterroni 다중 비교 테스트). (도 2b) 6 주령의 야생형, 이형접합체 및 동형접합체 마우스의 코-항문 길이(mm)(\*;  $p < 0.02$ ; Bonterroni 다중 비교 테스트). (도 2c) 야생형 및 동형접합체 마우스의 육안 형태.

도 3a 및 도 3b는 야생형(도 3a) 및 동형접합체 녹아웃(도 3b) 마우스 유래의 헤마톡실린 및 에오신 염색된 대퇴부 연골의 대표 절편의 광학 현미경 이미지를 보여준다.

도 4a 내지 도 4f는 녹아웃(KO) 마우스의 침샘 내 자가리소좀의 축적을 입증한다. (도 4a 내지 도 4c) 점액성 및 장액성 세포로 구성된 야생형 마우스 침샘 파리의 개관을 보여주는 EM. (도 4d) KO 침샘 파리의 개관. KO에서는 큰 공포(vacuole)의 대량 축적에 의해 전반적 구조가 파괴되어 있다. (도 4e 내지 도 4f) 단일 막에 의해 둘러싸여 있고 분해되지 않은 물질을 함유하는, (도 4d)로부터의 공포의 더 높은 배율. 확대 영역은 (도 4d)에서 박스로 표시된다. AL, 자가리소좀; Mu, 점액성 세포; N, 핵; SG; 분비성 과립.

도 5a 내지 도 5d는 야생형(뚫린 원) 및 KO 마우스(채워진 원)의 혈청에서의 리소좀 효소 활성을 표시된 바와 같이 보여준다. N-아세틸글루코사미니다아제(도 5a),  $\beta$ -헥소사미니다아제 A(도 5b),  $\beta$ -갈락토시다아제(도 5c) 및  $\beta$ -글루쿠로니다아제(도 5d)의 활성이 나타난다.

도 6a 및 도 6b는 주사를 위한 실험 일정의 개관을 제공한다. (도 6a) 6 주령의 바이러스 벡터 주사된 마우스에 대한 연구의 장기간 처리를 위한 일정. (도 6b) 각 처리 그룹에 대해 주사된 마우스의 총 수(n)가 표시되어 있다.

도 7a는 마우스 GNPTAB cDNA를 함유하는 pAAV2/8-GNPTAB 벡터의 개략도이다. 마우스 GNPTAB cDNA 서열은 GenBank 수탁 번호 NM\_001004164.2에 기반한다. 뉴클레오타이드 서열은 마우스에서의 발현을 위해 코돈 최적화되었다. 아미노산 서열은 변하지 않는다.

도 7b는 대조군 한 배 새끼에 비하여 AAV-GNPTAB로 주사된 KO 마우스로부터의 간의 정량적 분석을 보여준다.

도 8a 및 도 8b는 대조군 및 AAV-GNPTAB 처리된 KO 마우스에 대한 시간에 따른 시작 중량으로부터의 체중 변화를 나타낸다. (도 8a) 대조군 마우스 및 AAV-GNPTAB 처리된 KO 마우스의 총 체중(\*  $p < 0.05$  Dunnett 다중 비교 테스트). (도 8b) 시간에 따른 시작 중량으로부터의 중량 변화량으로서 표현된 데이터.

도 9a 및 도 9b는 대조군 및 AAV-GNPTAB 처리된 KO 마우스에 대한 시간에 따른 시작 신장으로부터의 신장 변화를 나타낸다. (도 9a) 신체 길이의 주사 전과 주사 후 6 주를 비교한 비율로 표현된 데이터 (도 9b) 신체 길이의 주사 전과 주사 후 32 주를 비교한 비율로 표현된 데이터.

도 10a 내지 도 10c는 주사 전(도 10a), 주사 후 16 주(도 10b) 및 주사 후 32 주(도 10c)에서의 골 무기질 밀

도의 수준을 보여주는 히스토그램을 제공한다. (도 10a) 동형접합체 및 AAV-GNPTAB로 처리된 동형접합체로부터의 데이터를 야생형 및 이형접합체의 데이터와 비교하였다(†;  $p < 0.05$ , ‡; 야생형과 비교하여  $p < 0.02$ , \*;  $p < 0.02$ , \*\*; 이형접합체와 비교하여  $p < 0.002$ ). AAV-GNPTAB 처리는 처리 후 16 주(도 10b) 및 처리 후 32 주(도 10c) 동형접합체 마우스에서 BMD 비율(Tx 후/Tx 전)의 통계적으로 유의미한 증가를 야기하였다. (도 10b) 처리 후 16 주에, AAV-GNPTAB로 처리된 GNPTAB 공백(null) 마우스는 다른 마우스보다 BMD 비율에서의 유의미한 증가를 나타내었다(\*\*;  $P < 0.02$ ). (도 10c) 처리 후 32 주에, GNPTAB 처리 마우스에서 BMD 비율에서의 유의미한 차이가 관찰되었다(#;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.02$ ).  $P$  값은 양쪽 꼬리 t-검정(two-tailed t-test), 비대응표본 t-검정(unpaired t-test) 분석에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM으로 표시된다.

도 11a 내지 도 11c는 주사 전(도 11a), 주사 후 16 주(도 11b), 및 주사 후 32 주(도 11c)에서의 골 무기질 함량의 수준을 보여주는 히스토그램을 제공한다. (도 11a) 동형접합체 및 AAV-GNPTAB로 처리된 동형접합체로부터의 데이터를 야생형 및 이형접합체의 데이터와 비교하였다(†;  $p < 0.05$ , ‡; 야생형과 비교하여  $p < 0.02$ , \*;  $p < 0.02$ , \*\*; 이형접합체와 비교하여  $p < 0.002$ ). AAV-GNPTAB 처리는 처리 후 16 주(도 11b) 및 처리 후 32 주(도 11c) 동형접합체 마우스에서 BMD 비율(Tx 후/Tx 전)의 통계적으로 유의미한 증가를 야기하였다. (도 11b) 처리 후 16 주에, AAV-GNPTAB로 처리된 GNPTAB 공백(null) 마우스는 다른 마우스보다 BMD 비율에서의 유의미한 증가를 나타내었다(\*\*;  $P < 0.02$ ). (도 11c) 처리 후 32 주에, GNPTAB 처리 마우스에서 BMD 비율에서의 유의미한 차이가 관찰되었다(#;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.02$ ).  $P$  값은 양쪽 꼬리 t-검정, 비대응표본 t-검정 분석에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM으로 표시된다.

도 12a 및 도 12b는 주사 전의 제지방 질량 백분율의 수준(도 12a) 및 주사 후 32 주의 제지방 질량 백분율의 변화(도 12b)를 보여주는 히스토그램을 제공한다. (도 12a) 동형접합체, 및 AAV-GNPTAB로 처리된 동형접합체로부터의 데이터를 야생형 및 이형접합체의 데이터와 비교하였다(†; 야생형과 비교하여  $p < 0.02$ , \*;  $p < 0.05$ , \*\*; 이형접합체와 비교하여  $p < 0.001$ ). (도 12b) 처리 후 32 주에, AAV-GNPTAB 처리 마우스에서 제지방 질량 %의 변화가 관찰되지 않았다.  $P$  값은 양쪽 꼬리 t-검정, 비대응표본 t-검정 분석에 의해 결정되었다. 데이터는 평균±SEM으로 표시된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 일부 양태에서, 본 발명은 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 알파 및 베타 서브유닛(GNPTAB)을 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터를 제공한다. 본 개시의 rAAV 벡터를 포함하는 rAV 입자뿐만 아니라 본 개시의 rAAV 입자를 포함하는 약학적 조성물이 본원에서 추가로 제공된다.
- [0026] 일부 양태에서, 본 발명은 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료하는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하며, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하는 방법을 추가로 제공한다. 유효량의 rAAV 입자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 갖는 포유동물에서의 신체 크기, 골 무기질 함량 및/또는 골 무기질 밀도를 증가시키는 방법으로서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 포함하며, rAAV 벡터는 GNPTAB를 인코딩하는 핵산 및 적어도 하나의 AAV ITR을 포함하는 방법이 본원에서 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, GNPTAB의 발현은 신체 크기, 골 무기질 함량 및/또는 골 무기질 밀도에 있어서의 증가를 야기한다.
- [0027] 일부 양태에서, 본 발명은, 예를 들어, 본 개시의 rAAV 벡터, rAAV 입자 또는 약학적 조성물을 이용하여 ML II 또는 ML III를 치료하기 위한 용도 및/또는 키트를 추가로 제공한다.
- [0028] I. 일반 기술
- [0029] 본원에서 기재되거나 참조되는 기술 및 절차는 당업자에 의해 통상적 방법론, 예를 들어, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4<sup>th</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6<sup>th</sup> ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular*



*Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); 및 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011)에 기재된 널리 이용되는 방법론을 이용하여 일반적으로 잘 이해되고 통상적으로 이용된다.

## [0030] II. 정의

[0031] 본원에 사용된 "백터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포로 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0032] 본원에 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드인, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머 형태를 지칭한다. 따라서, 이 용어는 단일-, 이중-, 또는 다중-가닥의 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기를 포함하는 폴리머, 또는 기타 천연의, 화학적 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연의, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 핵산의 백본은 당 및 인산기 (RNA 또는 DNA에서 전형적으로 발견될 수 있는), 또는 변형되거나 치환된 당 또는 인산기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 핵산의 백본은 포스포라미데이트와 같은 합성 서브유닛의 폴리머를 포함할 수 있어, 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이트(P-NH<sub>2</sub>) 또는 혼합된 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 추가적으로, 이중-가닥의 핵산은 상보적인 가닥을 합성하고 가닥들을 적절한 조건 하에서 어닐링하거나, 적절한 프라이머와 함께 DNA 중합효소를 사용하여 새롭게(*de novo*) 상보적인 가닥을 합성함으로써, 화학적 합성의 단일 가닥의 폴리뉴클레오티드 산물로부터 취득될 수 있다.

[0033] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위하여 상호 교환적으로 사용되고, 최소한의 길이로 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 폴리머는 천연 또는 비-천연 아미노산 잔기를 함유할 수 있고, 펩티드, 올리고펩티드, 아미노산 잔기의 이합체, 삼합체 및 다합체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편 둘 다 정의에 의해 포괄된다. 용어는 또한 폴리펩티드의 발현-후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩티드"는, 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 원상태 서열에 대한 결실, 첨가 및 치환(일반적으로 사실상 보존적 치환)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이들 변형은 부위-지정 돌연변이 유발을 통해서와 같이 계획적일 수 있거나, 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우연적일 수 있다.

[0034] "재조합 바이러스 백터"는 하나 이상의 이중 서열(즉, 바이러스 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드 백터를 지칭한다. 재조합 AAV 백터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나, 예를 들어, 두 개의, 역위 말단 반복 서열(ITR)이 측면에 배치된다.

[0035] "재조합 AAV 백터(rAAV 백터)"는 적어도 하나, 예를 들어, 두 개의, AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)이 측면에 배치된, 하나 이상의 이중 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 백터를 지칭한다. 이러한 rAAV 백터는 적합한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적합한 헬퍼 기능을 발현하고), AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 숙주 세포 내에 존재할 때 복제될 수 있고 감염성 바이러스 입자 내로 패키징될 수 있다. rAAV 백터가 더 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 내에 또는 클로닝이나 형질감염에 사용되는 플라스미드와 같은 또다른 백터 내에) 도입될 때, rAAV 백터는 AAV 패키징 기능 및 적합한 헬퍼 기능의 존재 하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "구제"될 수 있는 "프로-백터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 백터는 지질과 복합된, 리포솜 내에 캡슐화된, 그리고, 구현예에서, 바이러스 입자, 특히 AAV 입자 내에 캡시드화된, 플라스미드, 선형의 인공 염색체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다수의 형태 중

입자의 형태일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드 내로 패키징되어 "재조합 아데노-관련 바이러스 입자 (rAAV 입자)"를 생성할 수 있다.

- [0036] "rAAV 바이러스" 또는 "rAAV 바이러스 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질 및 캡시드화된 rAAV 벡터 게놈으로 구성되는 바이러스 입자를 지칭한다.
- [0037] "이종"은 비교되는 대상 또는 도입 또는 편입되는 대상의 나머지와 유전자형적으로 구별되는 대상으로부터 유래됨을 의미한다. 예를 들어, 유전자 조작 기술에 의해 상이한 세포 유형으로 도입된 핵산은 이종 핵산이다(그리고 발현될 때, 이종 폴리펩티드를 인코딩할 수 있다). 유사하게, 바이러스 벡터 내로 도입되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 부분)은 벡터에 대해 이종 뉴클레오티드 서열이다.
- [0038] 용어 "전이유전자"는 세포 내로 도입되고 RNA로 전사될 수 있으며, 선택적으로, 적절한 조건 하에서 번역되고/번역되거나 발현될 수 있는 핵산을 지칭한다. 양태에서, 이는 도입된 세포에 원하는 특성을 부여하거나, 다르게는 원하는 치료적 또는 진단적 결과를 유도한다. 또다른 양태에서, 이는 siRNA와 같은, RNA 간섭을 매개하는 분자로 전사될 수 있다.
- [0039] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "게놈 입자(gp)", "게놈 등가물", 또는 "게놈 카피"는 감염성 또는 기능성과 무관하게, 재조합 AAV DNA 게놈을 함유하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 조제물 내의 게놈 입자의 수는 본원의 실시예에 기재된 것과 같은 절차, 또는 예를 들어, Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278에 기재된 것과 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.
- [0040] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자", 또는 "복제 단위"는 예를 들어, McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973에 기재된 바와 같이, 복제 중심 분석으로도 알려져 있는, 감염성 중심 분석에 의해 측정되는, 감염성 있고 복제 적격한 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.
- [0041] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본원의 실시예에 기재된 것과 같은, 또는 예를 들어, Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; or in Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532(LFU 분석)에 기재된 것과 같은 기능성 분석으로 측정되는, 기능성 전이유전자 산물의 생산을 야기하는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.
- [0042] "역위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 당분야에서 잘 이해되는 용어이며, 반대 방향의 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다.
- [0043] 당분야에서 널리 이해되는 용어인 "AAV 역위 말단 반복(ITR)" 서열은 원상태 단일-가닥의 AAV 게놈의 양 말단에 존재하는 대략 145 개 뉴클레오티드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽 125 개 뉴클레오티드는 두 개의 택일적 방향 중 하나로 존재할 수 있어, 상이한 AAV 게놈들 사이에 그리고 단일 AAV 게놈의 두 개의 끝 사이에 이질성을 유도한다. 또한, 가장 바깥쪽 125 개 뉴클레오티드는 몇 개의 더 짧은 자가-상보성(self-complementarity) 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 지정됨)을 함유하여, ITR의 이 부분 내에서 가닥내 염기쌍 형성이 일어날 수 있도록 한다.
- [0044] "말단 분해 서열(terminal resolution sequence)" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 동안에 AAV rep 단백질에 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단에 불응한다. "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 다수의 형태 중 임의의 형태로 제공될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당분야에 공지되어 있다.
- [0045] "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 다수의 형태 중 임의의 형태로 제공될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당분야에 공지되어 있다.
- [0046] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 (결함 파보바이러스인) AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 백시니아와 같은 폭스바이러스, 및 배클로바이러스를 포함하는 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 다수의 상이한 하위그룹을 포괄하지만, 하위그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 일반적으로 이용된다. 인간, 비-인간 포유류 및 조류 기원

의 다수의 아데노바이러스가 알려져 있으며 ATCC와 같은 기탁처로부터 이용 가능하다. 또한 ATCC와 같은 기탁처로부터 이용 가능한 헤르페스 패밀리 바이러스에는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV) 및 가성 광견병 바이러스(PRV)가 포함된다. 기탁처로부터 이용 가능한 배칼로바이러스에는 오토그라파 캘리포니카(*Autographa californica*) 핵 다면체형성 바이러스가 포함된다.

[0047] 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열에 대한 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고 필요한 경우 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 갭을 도입한 후, 참조 폴리펩티드 또는 핵산 서열에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드의 백분율로 정의되며, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않는다. 아미노산 또는 핵산 서열 동일성 백분율의 결정 목적을 위한 정렬은 당분야의 기술 수준 내의 다양한 방식으로, 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어 프로그램, 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel *et al.*, eds., 1987), Supp. 30, section 7.7.18, Table 7.7.1에 기재된 것들, 및 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 포함하는 것들을 이용하여 달성될 수 있다. 정렬 프로그램의 하나의 예는 ALIGN Plus(Scientificand Educational Software, Pennsylvania)이다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 본원에서의 목적을 위해, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이와, 또는 이에 대비한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 %(주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이와, 또는 이에 대비하여 일정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{X}{Y}$ , 여기서 X는 A 및 B의 그 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링되는 아미노산 잔기의 수이며, Y는 B에서의 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %는 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 같지 않을 것임이 이해될 것이다. 본원에서의 목적을 위해, 주어진 핵산 서열 D에 대한, 이와, 또는 이에 대비한 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성 %(주어진 핵산 서열 D에 대한, 이와, 또는 이에 대비하여 일정 핵산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C로서 대안적으로 표현될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:  $100 \times \frac{W}{Z}$ , 여기서 W는 C 및 D의 그 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링되는 뉴클레오티드의 수이며, Z는 D에서의 뉴클레오티드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 같지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 %는 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 %와 같지 않을 것임이 이해될 것이다.

[0048] "단리된" 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질) 또는 세포는 그것이 자연적인 환경의 성분으로부터 확인되고, 분리되고/분리되거나 회수되었음을 의미한다.

[0049] "유효량"은 임상 결과(예를 들어, 증상의 완화, 임상적 종말점의 달성 등)를 포함하는, 유익한 또는 원하는 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 1 회 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질환 상태의 측면에서, 유효량은 질환을 완화시키거나, 안정화하거나, 또는 진행을 지연시키기에 충분한 양이다. 예를 들어, 유효량의 rAAV 입자는 치료적 폴리펩티드 또는 치료적 핵산과 같은 이중 핵산의 원하는 양을 발현한다.

[0050] "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물에는 가축(예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류(예를 들어, 인간 및 원숭이와 같은 비-인간 영장류), 토끼, 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 일정 구현예에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0051] 본원에 사용된 "치료"는 유익한 또는 원하는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 원하는 임상 결과는 검출 가능하든 검출 불가능하든 간에, 증상의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(예를 들어, 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산(예를 들어, 전이) 예방, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 완화 또는 경감 및 (부분적 또는 전체적이든) 차도를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존에 비해 연장되는 생존을 의미할 수 있다.

[0052] 유전자 또는 코딩 서열과 관련하여 사용될 때, "N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제(GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제 또는 GNPTAB로도 알려진)"는 UDP-N-아세틸-D-글루코사민 및 리소좀-효소 D-만노스로부터 리소좀-효소 N-아세틸-글루코사미닐-포스포-D-만노스 및 UMP의 형성을 수반하는 화학 반응을 촉매하는 효소(EC code 2.7.8.17)의 알파 및 베타 서브유닛을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, "N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제(GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제 또는 GNPTAB로도 알려진)"는 전술한 효소의 알파 및 베타 서브유닛을 지칭한다(Kudo, M. *et al.*, *J Biol Chem.* 2005, 280(43):36141-9; Gelfman, CM *et al.*, *Invest. Ophthamol. Vis. Sci.* 2007, 48(11):5221-5228). 전체 GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제 효소 복합체는  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ , 및  $\gamma_2$  서브유닛을 포함하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 알파 및

베타 서브유닛이 촉매 활성을 위해 필요하다. EC code 2.7.8.17에 의해 기재된 반응을 촉매하고/촉매하거나 GO term GO: 0003976에 의해 기재된 분자 기능을 수행하는 것으로 알려지거나 예측되는 임의의 효소는 본 개시의 GNPTAB일 수 있다. 일부 구현예에서, GNPTAB는 변이체 GNPTAB이다. 일부 구현예에서, GNPTAB는 절단된 GNPTAB이다. 일부 구현예에서, GNPTAB를 인코딩하는 핵산은 약 4.7 kb이다. 일부 구현예에서, GNPTAB를 인코딩하는 핵산은 약 4.7 kb 미만이다. 일부 구현예에서, 변이체(예를 들어, 절단된) GNPTAB는 알파 및 베타 서브유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, 변이체 GNPTAB(예를 들어, 절단된 GNPTAB)는 원상태 GNPTAB와 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 일부 구현예에서, 변이체 GNPTAB(예를 들어, 절단된 GNPTAB)는 원상태 GNPTAB의 활성을 적어도 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 또는 10% 유지한다. 인간 GNPTAB의 예는 GenBank Accession No. NP\_077288.2 및 NM\_024312.4에 의해 제공된다. 인간 GNPTAB 아미노산 서열의 예는 SEQ ID NO:1에 의해 제공된다. 마우스 GNPTAB의 예는 GenBank Accession No. NP\_001004164에 의해 제공된다. 마우스 GNPTAB 아미노산 서열의 예는 SEQ ID NO:2에 의해 제공된다. GNPTAB의 추가적인 예는 GenBank Accession Nos. XP\_001155334 및 XP\_509312 (침팬지(*Pan troglodytes*)), XP\_002687680 및 NP\_001179157 (소(*Bos taurus*)), XP\_416329 (닭(*Gallus gallus*)), XP\_532667 (개(*Canis familiaris*)), XP\_001497199 (말(*Equus caballus*)), XP\_001079967 및 XP\_343195 (랫(*Rattus norvegicus*)) 및 NP\_001038233 (제브라피쉬(*Danio rerio*))에 의해 제공된다.

[0053] "뮤코지질증 II 형"(용어 MLII, ML-II, 및 ML II형은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다) 및 "뮤코지질증 III 형"(용어 MLIII, ML-III, 및 ML III형은 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다)은 GNPTAB 유전자 내 돌연변이에 의해 야기된 질환 부류를 지칭한다. 두 질환 모두는 상염색체 열성 장애이다. 그러나, MLIII은 전형적으로 MLII에 비해 더 약한 GNPTAB 기능 상실을 야기하는 돌연변이와 연관된다. 이와 같이, MLII는 전형적으로 MLIII보다 더 심한 질환 표현형을 야기한다. MLII는 I-세포병으로도 알려져 있다. MLII의 추가적인 기제는 OMIM 엔트리 #252500에서 확인될 수 있다. MLIII는 가성 후를러 다발성 이영양증으로도 알려져 있다. MLIII의 추가적인 기제는 OMIM 엔트리 #252600에서 확인될 수 있다.

[0054] "닭 β-액틴(CBA) 프로모터"는 닭 β-액틴 유전자(예를 들어, 닭(*Gallus gallus*) 베타 액틴, GenBank Entrez Gene ID 396526)로부터 유래되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본원에서 사용되는 "닭 β-액틴 프로모터"는 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소, 닭 β-액틴 유전자의 프로모터 및 제1 엑손 및 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체, 예를 들어 Miyazaki, J., *et al.* (1989) Gene 79(2):269-77에 기술된 서열을 포함하는 프로모터를 지칭할 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "CAG 프로모터"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터"는 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0055] -106 업스트림 서열이 프로모터 활성화에 현저하게 영향을 미치지 않으면서 결실될 수 있음을 나타내는 결실 연구(Quitschke *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:9539-9546, 1989)에 기반하여 단축된 닭 베타 액틴 프로모터가 선택되었다.

[0056] 본원에서 값 또는 파라미터에서 "약(about)"의 언급은 그 값 또는 파라미터 그 자체로 향하는 구현예를 포함한다(그리고 기술한다). 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기제는 "X"의 기제를 포함한다.

[0057] 본원에서 사용되는 관사의 단수형 "a", "an" 및 "the"는 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.

[0058] 본원에 기재된 본 발명의 양태 및 구현예는, 양태 및 구현예를 "포함하는", 이들로 "구성되는" 및/또는 이들로 "필수적으로 구성되는" 것을 포함한다고 이해된다.

### [0059] III. 벡터

[0060] 일정 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 rAAV 벡터, 예를 들어, 방법들 중 임의의 방법에서의 사용에 적합한, rAAV 입자, 및/또는 약학적 조성물을 제공한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이중 핵산(예를 들어, 기능성 GNPTAB 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열)은 본 개시의 rAAV 벡터를 통하여 대상으로 전달된다.

[0061] 본 개시의 일정 양태는 N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 알파 및 베타 서브유닛(GNPTAB), 예를 들어, GNPTAB 폴리펩티드, 또는 GNPTAB 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산에 관한 것이다. 당분야에 알려진 바와 같이, N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제(N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제로도 알려진) 효소는 두 개의 알파, 두 개의 베타, 및 두 개의 감마 서브유닛을 포함한다. 알파 및 베타 서브유닛은 GNPTAB 유전자(마우스에서는 *GNPTA*, I-세포병 또는 *ICD*, 또는 *EG432486* 또는 *mKIAA1208*로도 알려진)에 의해 인코딩된다. GNPTAB 유전자의 예로는, 예를 들어, 인간 GNPTAB(예를 들어, NCBI Gene ID No. 79158에 의해 기재된) 및 마우스



스 GNPTAB(예를 들어, NCBI Gene ID No. 432486에 의해 기재된)이 포함된다.

- [0062] 일부 구현예에서, GNPTAB 폴리펩티드는 인간 GNPTAB 폴리펩티드일 수 있다. 인간 GNPTAB 폴리펩티드 서열은 비제한적으로 NCBI Reference Sequence No. NP\_077288을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, GNPTAB 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB 폴리펩티드는 SEQ ID NO:1의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB은 절단된 GNPTAB이다. 일부 구현예에서, GNPTAB를 인코딩하는 핵산은 약 4.7 kb이다. 일부 구현예에서, GNPTAB를 인코딩하는 핵산은 약 4.7 kb 미만이다. 일부 구현예에서, 변이체(예를 들어, 절단된) GNPTAB는 알파 및 베타 서브유닛을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB 폴리펩티드는 야생형 GNPTAB 폴리펩티드의 활성의 적어도 일부분(예를 들어, 야생형 GNPTAB 활성의 적어도 약 5%, 10%, 25%, 50%, 75% 또는 100% 중 임의의 값)을 유지하는 변이체 GNPTAB 폴리펩티드(예를 들어, 절단된 GNPTAB)이다. 일부 구현예에서, 변이체 GNPTAB 폴리펩티드(예를 들어, 절단된 GNPTAB)는 야생형 GNPTAB 폴리펩티드에 비해 큰 활성을 가진다(예를 들어, 야생형 GNPTAB에 비해 적어도 약 125%, 150%, 200%, 300%, 또는 500% 중 임의의 값만큼 큰 활성).
- [0063] 일부 구현예에서, 이중 핵산(예를 들어, GNPTAB를 인코딩하는 핵산)은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 예시적인 프로모터에는 사이토메갈로바이러스(CMV) 초기기(immediate early) 프로모터, RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나아제-1(PGK) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), E2F 프로모터, 텔로머라아제(hTERT) 프로모터; 사이토메갈로바이러스 인핸서/답 베타-액틴/토끼  $\beta$ -글로빈 프로모터(CAG 프로모터; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108(2):193-9) 및 연장 인자 1-알파 프로모터(EF1-알파) 프로모터가 포함된다(Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91(2):217-23 및 Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10). 프로모터는 항상성, 유도성 또는 억제성 프로모터일 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 인간  $\beta$ -글루쿠로니다아제 프로모터, 또는 닭  $\beta$ -액틴(CBA) 프로모터에 연결된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 변형된 또는 절단된 CBA 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 단축된 CMV 인핸서를 포함한다.
- [0064] 일부 구현예에서, 벡터는 인트론을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 인트론은 닭 베타-액틴 및 토끼 베타-글로빈으로부터 유래된 키메라 인트론이다. 일부 구현예에서, 인트론은 마우스 미소 바이러스(Minute virus of mice, MVM) 인트론이다.
- [0065] 일부 구현예에서, 벡터는 폴리아데닐화(polyA) 서열을 포함한다. 폴리아데닐화 서열의 다수의 예가 당분야에 공지되어 있다, 예를 들어, 소 성장 호르몬(BGH) poly(A) 서열(예를 들어, 수탁 번호 EF592533 참고), SV40 폴리아데닐화 서열, 및 HSV TK pA 폴리아데닐화 서열.
- [0066] 이론에 얽매이지 원하지 않고, GNPTAB 코딩 서열의 큰 크기 때문에, rAAV 벡터의 다른 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론, polyA 서열 등)의 크기를 최소화하는 것이 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 프로모터의 단축된 변이체가 rAAV 벡터 내에 사용될 수 있다. 프로모터(예를 들어, 상기 나열된 프로모터)의 단축된 변이체를 생성하는 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 관심 프로모터는 프로모터 서열 내에 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실 및/또는 치환을 도입함에 의해 돌연변이될 수 있고, 그러한 변이체 프로모터 서열은 각자의 프로모터 서열의 조절하에 있는 리포터 작제물을 포함하는 벡터 내로 개별적으로 클로닝될 수 있다. 이 시스템은 지정된 강도(예를 들어, 생산된 전사체의 양)를 보유하는 프로모터의 단축된 변이체를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 벡터는, 예를 들어, 본원에 기재된, 변형, 절단 및/또는 단축된 CMV 인핸서/CBA 프로모터를 포함할 수 있다. 유사한 방법이 전사, mRNA 안정성, 및/또는 스플라이싱의 적절한 수준을 보유하는 인트론의 단축된 변이체를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 벡터는 본원에 기재된 단축된 인트론을 포함할 수 있다. 유사한 방법이 전사, mRNA 안정성, 및/또는 폴리아데닐화의 적절한 수준을 보유하는 polyA 서열의 단축된 변이체를 확인하기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 벡터는 본원에 기재된 단축된 polyA 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서 GTNAP 유전자는 SEQ ID NO:1 또는 2의 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0067] 본 발명은 치료 폴리펩티드 및/또는 핵산을 인코딩하는 하나 이상의 핵산 서열의 도입을 위한 재조합 바이러스 계놈의 rAAV 바이러스 입자로 패키징하기 위한 용도를 고려한다. 재조합 바이러스 계놈은 치료 폴리펩티드 및/

또는 핵산의 발현을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, 본 개시의 ITR, 리보솜 결합 요소, 종결 부위, 인핸서, 선택 마커, 인트론, polyA 신호, 및/또는 복제의 개시점을 포함할 수 있다.

[0068]

#### IV. 바이러스 입자 및 바이러스 입자 생산 방법

[0069]

본 개시의 일정 양태는, 예를 들어, 본 개시의 rAAV 벡터를 함유하는, rAAV 입자에 관한 것이다. AAV 입자에서, 핵산은 AAV 입자 내에 캡시드화된다. AAV 입자는 캡시드 단백질을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 관심 코딩 서열(들)(예를 들어, GNPTAB 코딩 서열) 전사 방향으로 작동 가능하게 연결된 성분, 전사 개시 및 종결 서열을 포함하는 제어 서열을 포함함으로써 발현 카세트를 형성한다. 발현 카세트는 5' 및 3' 말단 상에서 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열이 측면에 배치된다. "기능적 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 구제, 복제 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 모두 이의 전문이 참조로 본원에 편입되는 Davidson *et al.*, PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini *et al.*, J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; 및 Pechan *et al.*, Gene Ther., 2009, 16:10-16 참고. 본 발명의 일부 양태의 실시를 위해, 재조합 벡터는 캡시드화에 필수적인 AAV의 적어도 모든 서열 및 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조를 포함한다. 본 발명의 벡터에서 이용하기 위한 AAV ITR은 반드시 야생형 뉴클레오티드 서열(예를 들어, Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801에 기재된)을 가질 필요는 없으며, 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변형될 수 있거나 AAV ITR은 임의의 몇몇 AAV 혈청형에서 유래될 수 있다. AAV의 40 가지를 초과하는 혈청형이 현재 공지되어 있으며, 새로운 혈청형 및 기존 혈청형의 변이체가 계속 확인되고 있다. Gao *et al.*, PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, PNAS, 2003, 100(10):6081-6; and Bossis *et al.*, J. Virol., 2003, 77(12):6799-810 참고. 임의의 AAV 혈청형의 이용은 본 발명의 범위 내인 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 등을 비제한적으로 포함하는 AAV 혈청형에서 유래되는 벡터이다. 일부 구현예에서, AAV ITR에서의 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR 등이다.

[0070]

일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6(예를 들어, 야생형 AAV6 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2012/0164106호에 기재된 ShH10와 같은 변이체 AAV6 캡시드), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9(예를 들어, 야생형 AAV9 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2013/0323226호에 기재된 변형된 AAV9 캡시드), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 티로신 캡시드 돌연변이체, 헤파린 결합 캡시드 돌연변이체, AAV2R471A 캡시드, AAVAAV2/2-7m8 캡시드, AAV DJ 캡시드(예를 들어, AAV-DJ/8 캡시드, AAV-DJ/9 캡시드, 또는 U.S. PG 공개 제2012/0066783호에 기재된 임의의 다른 캡시드), AAV2 N587A 캡시드, AAV2 E548A 캡시드, AAV2 N708A 캡시드, AAV V708K 캡시드, 염소 AAV 캡시드, AAV1/AAV2 키메라 캡시드, 소 AAV 캡시드, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 캡시드, 또는 U.S. 특허 번호 제8,283,151호 또는 국제 공개 번호 WO/2003/042397호에 기재된 AAV 캡시드를 포함한다. 추가 구현예에서, rAAV 입자는 Clades A-F로부터의 AAV 혈청형의 캡시드 단백질을 포함한다.

[0071]

상이한 AAV 혈청형이 특정한 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정한 표적 조직(예를 들어, 질환 조직) 내에서 특이적 세포 유형을 표적화하기 위해 이용된다. rAAV 입자는 동일한 혈청형 또는 혼합된 혈청형에서 유래되는 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, rAAV 입자는 동일한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR 및 캡시드를 함유할 수 있거나, rAAV 입자는 rAAV 입자의 캡시드와 상이한 AAV 혈청형에서 유래된 하나 이상의 ITR 을 함유할 수 있다. 일정 구현예에서, rAAV 입자는 AAV8 캡시드 및 하나 이상의(예를 들어, 2 개) AAV2 ITR을 함유한다.

[0072]

#### AAV 입자의 생산

[0073]

형질감염, 안정적 세포주 생산, 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드(Conway, JE *et al.*, (1997) J. Virology 71(11):8780-8789) 및 배콜로바이러스-AAV 하이브리드(Urabe, M. *et al.*, (2002) Human Gene Therapy 13(16):1935-1943; Kotin, R. (2011) Hum Mol Genet. 20(R1): R2-R6)를 포함하는 감염성 하이브리드 바이러스 생산 시스템을 포함하는 rAAV 벡터의 생산을 위한 다수의 방법이 당분야에 공지되어 있다. rAAV 바이러스 입자의 생산을 위한 rAAV 생산 배양은 1) 적합한 숙주 세포, 2) 적합한 헬퍼 바이러스 기능, 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 산물; 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열이 측면에 배치된 핵산(예를 들어, 치료 핵산)(예를 들어, GNPTAB을 인코딩하는 AAV 게놈); 및 5) rAAV 생산을 지원하는 적합한 배지 및 배지 성분을 모두 필요로 한다. 일부 구현예에서, 적합한 숙주 세포는 영장류 숙주 세포이다. 일부 구현예에서, 적합한 숙주 세포는 HeLa, A549, 293, 또는 Perc.6 세포와 같은 인간-유래 세포주이다. 일부 구현예에서, 적합

한 헬퍼 바이러스 기능은 야생형 또는 돌연변이체 아데노바이러스(예를 들어, 온도감수성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스(HSV), 배콜로바이러스, 또는 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 작체물에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자 산물은 임의의 AAV 혈청형 유래일 수 있다. 일반적으로, 의무적인 것은 아니지만, AAV rep 유전자 산물은 rep 유전자 산물이 rAAV 계놈을 복제하고 패키징하는 기능을 할 수 있는 한, rAAV 벡터 계놈의 ITR과 동일한 혈청형이다. 당분야에 알려진 적합한 배지가 rAAV 벡터의 생산을 위해 이용될 수 있다. 이들 배지에는 비제한적으로, MEM(개질 Eagle 배지), DMEM(Dulbecco 개질 Eagle 배지)를 포함하는 Hyclone Laboratories 및 JRH에서 생산되는 배지, 각각 그 전문이, 특히 재조합 AAV 벡터의 생산에서의 이용을 위한 주문 제작 배지 제형에 대해, 본원에 참조로 편입된 U.S. 특허 번호 제6,566,118호에 기재된 것들 및 U.S. 특허 번호 제6,723,551호에 기재된 Sf-900 II SFM 배지와 같은 주문 제작 제형이 포함된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, AAV 헬퍼 기능은 배콜로바이러스에 의해 제공되며 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*(Sf9)) 세포)이다.

[0074] rAAV 입자를 생산하는 하나의 방법은 삼중 형질감염 방법이다. 간략하게, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께, rep 유전자 및 캡시드 유전자를 함유하는 플라스미드는 세포주(예를 들어, HEK-293 세포) 내로 형질감염될 수 있고(예를 들어, 칼슘 포스페이트 방법을 이용), 바이러스가 수집되고 선택적으로 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 숙주 세포 내로 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산의 삼중 형질감염에 의해 생산되었으며, 숙주 세포에 대한 핵산의 형질감염은 rAAV 입자를 생산할 수 있는 숙주 세포를 생성한다.

[0075] 일부 구현예에서, rAAV 입자는 생산체 세포주 방법에 의해 생산될 수 있다(Martin *et al.*, (2013) *Human Gene Therapy Methods* 24:253-269; U.S. PG 공개 번호 제US2004/0224411호; 및 Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:293-299 참고). 간략하게, 세포주(예를 들어, HeLa, 293, A549, 또는 Perc.6 세포주)는 rep 유전자, 캡시드 유전자, 및 프로모터-이종성 핵산 서열(예를 들어, GNPTAB)을 포함하는 벡터 계놈을 함유하는 플라스미드로 안정적으로 형질감염될 수 있다. 세포주는 rAAV 생산을 위한 선도 클론을 선택하기 위해 스크리닝될 수 있고, 이어서 생산 바이오리액터에서 팽창되고 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 또는 HSV)로 감염되어 rAAV 생산을 개시할 수 있다. 이후 바이러스는 수확될 수 있고, 아데노바이러스가(예를 들어, 열에 의해) 불활성화되고/불활성화되거나 제거될 수 있고, rAAV 입자가 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 구현예에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 인코딩하는 핵산, AAV rep 및 cap을 인코딩하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 인코딩하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 생산체 세포주에 의해 생산되었다. 본원에 기재된 바와 같이, 생산체 세포주 방법은 삼중 형질감염 방법에 비해 거대 계놈을 갖는 rAAV 입자의 생산을 위해 유리할 수 있다.

[0076] 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계놈은 생산체 세포주에서 안정적으로 유지된다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계놈은 하나 이상의 플라스미드 상에서 세포주 내로 도입되어 생산체 세포주를 생성한다. 일부 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 계놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 다른 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 계놈은 상이한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 플라스미드로 안정적으로 형질감염된 세포주는 세포주의 다회 계대(예를 들어, 세포의 5, 10, 20, 30, 40, 50회 또는 50회 초과 계대)동안 플라스미드를 유지한다. 예를 들어, 플라스미드(들)는 세포가 복제할 때 복제할 수 있거나, 플라스미드(들)는 세포 계놈 내로 통합될 수 있다. 플라스미드가 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 자체적으로 복제할 수 있도록 하는 다양한 서열이 확인되었다(예를 들어, Krysan, P.J. *et al.* (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033 참고). 일부 구현예에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커(예를 들어, 항생제 내성 마커)를 함유할 수 있다. 포유류 세포에서 일반적으로 이용되는 선택 마커에는 비제한적으로 블라스티시딘, G418, 하이그로마이신 B, 제오신, 퓨로마이신, 및 이의 유도체가 포함된다. 세포 내로의 핵산 도입 방법은 당분야에 공지되어 있으며, 비제한적으로 바이러스 형질도입, 양이온성 형질감염(예를 들어, DEAE-텍스트란과 같은 양이온성 중합체, 또는 리포펙타민과 같은 양이온성 지질 이용), 칼슘 포스페이트 형질감염, 미세주사, 입자 폭격, 전기천공, 및 나노입자 형질감염이 포함된다(더욱 상세한 내용에 대해서는, 예를 들어, Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178 참고).

[0077] 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계놈은 생산체 세포주의 계놈 내로 안정적으로 통합된다. 일부 구현예에서, AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 rAAV 계놈은 하나 이상의 플라스미드 상에서 세포주 내로 도입되어 생산체 세포주를 생성한다. 일부 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 계놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 다른 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및



rAAV 계놈은 상이한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커(예를 들어, 항생제 내성 마커)를 함유할 수 있다. 다양한 숙주 세포주 내로의 핵산의 안정적 통합을 위한 방법은 당분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 반복 선택(예를 들어, 선택 마커의 이용을 통하여)은 선택 마커(및 AAV cap 및 rep 유전자 및/또는 rAAV 계놈)를 함유하는 핵산이 통합된 세포에 대해 선택하기 위해 이용될 수 있다. 다른 구현예에서, 핵산은 부위-특이적 방식으로 세포주 내로 통합되어 생산체 세포주를 생성할 수 있다. 몇몇 부위-특이적 재조합 시스템이 당분야에 공지되어 있다, 예를 들어 FLP/FRT(예를 들어, O'Gorman, S. *et al.*(1991) *Science* 251:1351-1355 참고), Cre/loxP(예를 들어, Sauer, B. and Henderson, N.(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5166-5170 참고), 및 phi C31-att(예를 들어, Groth, A.C. *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:5995-6000 참고).

[0078] 일부 구현예에서, 생산체 세포주는 영장류 세포주(예를 들어, 비-인간 영장류 세포주, 예를 들어, Vero 또는 FRhL-2 세포주)에서 유래된다. 일부 구현예에서, 세포주는 인간 세포주에서 유래된다. 일부 구현예에서, 생산체 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 Perc.6®(Cruce11) 세포에서 유래된다. 예를 들어, 생산체 세포주를 생성하기 위해 AAV rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 핵산 및/또는 거대 rAAV 계놈을 세포주 내로 도입 및/또는 안정적 유지/통합하기 전에, 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 PERC.6®(Cruce11) 세포주, 또는 이의 유도체이다.

[0079] 일부 구현예에서, 생산체 세포주는 현탁액 중 성장을 위해 적응된다. 당분야에 공지된 바와 같이, 부착-의존적 세포는 전형적으로 기재, 예를 들어, 마이크로담체 비드 없이 현탁액 중 성장할 수 없다. 세포주를 현탁액 중 성장하도록 적응하는 것에는, 예를 들어, 교반 패들을 이용한 회전장치 배양으로 세포주를 성장시키는 것, 문침을 예방하기 위해 칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 배양 배지(및 선택적으로 소포체)를 이용하는 것, 실리콘화 화합물로 코팅된 배양 용기를 이용하는 것, 및 각 계대에서 (큰 군집에서 또는 용기 측면 상에서가 아닌) 배양물에서 세포를 선택하는 것이 포함될 수 있다. 추가적인 기재에 대해서는, 예를 들어, ATCC 자주 묻는 질문 문서 ([www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx](http://www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx) 에서 이용 가능) 및 본원에서 인용된 참고문헌을 참고.

[0080] 일부 양태에서, (a) rAAV 입자가 생산되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계로서, 숙주 세포가 (i) 하나 이상의 AAV 패키징 유전자로서, 각각의 상기 AAV 패키징 유전자가 AAV 복제 및/또는 캡시드화 단백질을 인코딩하는 것; (ii) 적어도 하나의 AAV ITR이 측면에 배치된 본원에 기재된 이중 핵산을 인코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 프로-벡터, 및 (iii) AAV 헬퍼 기능을 포함하는, 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 입자를 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 임의의 rAAV 입자의 생산 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR 등으로 구성된 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, 또는 AAVrh10이다. 일정 구현예에서, AAV에서의 핵산은 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 캡시드화 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 캡시드 rAAV2/HBoV1 혈청형 캡시드 단백질 또는 이의 돌연변이체로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 캡시드화 단백질은 AAV8 캡시드 단백질이다. 일부 구현예에서, rAAV 입자는 AAV8 캡시드 및 AAV2 ITR, 및 치료 전이유전자/핵산(예를 들어, GNPTAB을 인코딩하는 핵산)을 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 계놈을 포함한다.

[0081] 본 발명의 적합한 rAAV 생산 배양 배지는 0.5% 내지 20%(v/v 또는 w/v) 수준으로 혈청 또는 혈청-유래 재조합 단백질로 보충될 수 있다. 대안적으로, 당분야에 공지된 바와 같이, rAAV 벡터는 동물-유래 산물이 없는 배지로 또한 언급될 수 있는 무혈청 조건에서 생산될 수 있다. 당업자는 rAAV 벡터의 생산을 지원하기 위해 설계된 상업적 또는 주문제작 배지는 생산 배양물에서 rAAV의 역가를 증가시키기 위해 비제한적으로 글루코스, 비타민, 아미노산, 및 또는 성장 인자를 포함하는 당분야에 공지된 하나 이상의 세포 배양 성분으로 또한 보충될 수 있음을 이해할 수 있다.

[0082] rAAV 생산 배양물은 특정 숙주 세포가 이용되기에 적합한 다양한 조건 하에서(넓은 온도 범위에 걸쳐, 다양한 시간 길이 동안 등) 성장될 수 있다. 당분야에 공지된 바와 같이, rAAV 생산 배양물에는, 예를 들어 롤러 병, 중공 섬유 필터, 마이크로담체, 및 패키징-층 또는 유동화-층 바이옱터와 같은 적합한 부착-의존적 용기에서 배양될 수 있는 부착-의존적 배양물이 포함된다. rAAV 벡터 생산 배양물에는 또한, 예를 들어, 회전 장치 플라스크, 교반 탱크 바이옱터, 및 Wave 백 시스템과 같은 일회용 시스템을 포함하는 다양한 방식으로 배양될



수 있는, HeLa, 293, 및 SF-9 세포와 같은 현탁액-적응된 숙주 세포가 포함될 수 있다.

[0083] 본 발명의 rAAV 벡터 입자는 생산 배양물의 숙주 세포의 용해에 의해 또는, U.S. 특허 번호 제6,566,118호에 더욱 충분히 기재된 바와 같이), 온전한 세포로부터 배지 내로 rAAV 입자의 방출을 야기하는 것으로 당분야에 알려진 조건 하에 세포가 배양되는 경우, 생산 배양물로부터 사용된 배지의 수확에 의해 rAAV 생산 배양물로부터 수확될 수 있다. 세포를 용해시키는 적합한 방법 또한 당분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 다회 동결/해동 사이클, 초음파 분쇄, 마이크로유동화, 및 화학물질, 예를 들어, 계면활성제 및/또는 프로테아제로의 처리가 포함된다.

[0084] 추가의 구현예에서, rAAV 입자는 정제된다. 본원에서 사용되는 용어 "정제된"은 rAAV 입자가 자연적으로 발생하거나 이로부터 최초로 제조되는 경우에 또한 존재할 수 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 결여된 rAAV 입자의 조제물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 rAAV 입자는 공급원 혼합물, 예를 들어, 배양 용해물 또는 생산 배양물 상층액으로부터 이를 농축시키는 정제 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 농축은 다양한 방식, 예를 들어, 용액에 존재하는 DNase-내성 입자(DRP) 또는 게놈 카피(gc)의 비율, 또는 감염성에 의해 측정될 수 있거나, 공급원 혼합물에 존재하는 이차의 잠재적 간섭 물질, 예를 들어, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등을 포함하는 생산 배양물 오염물질 또는 공정중(in-process) 오염물질을 포함하는 오염물질과 관련하여 측정될 수 있다.

[0085] 일부 구현예에서, rAAV 생산 배양 수확물은 숙주 세포 파편을 제거하기 위해 정화된다. 일부 구현예에서, 생산 배양 수확물은, 예를 들어, 등급 DOHC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 등급 A1HC Millipore Millistak+HC Pod 필터, 및 0.2  $\mu\text{m}$  Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC 친수성 멤브레인 필터를 포함하는 일련의 텀스 필터를 통한 여과에 의해 정화된다. 정화는 당분야에 공지된 다양한 다른 표준 기술, 예를 들어, 원심분리 또는 당분야에 공지된 0.2  $\mu\text{m}$  이상의 포어 크기의 임의의 셀룰로스 아세테이트 필터를 통한 여과에 의해서도 달성될 수 있다.

[0086] 일부 구현예에서, rAAV 생산 배양 수확물은 생산 배양물에 존재하는 임의의 고분자량 DNA를 분해하기 위해 Benzonase®로 추가 처리된다. 일부 구현예에서, Benzonase® 분해는, 예를 들어, 30 분 내지 수 시간의 기간 동안 상온 내지 37°C 범위의 온도에서 최종 농도 1 내지 2.5 유닛/ml의 Benzonase®를 포함하는 당분야에 공지된 표준 조건 하에서 수행된다.

[0087] rAAV 입자는 하나 이상의 다음 정제 단계를 이용해서 단리되거나 정제될 수 있다: 평형 원심분리; 플로우-쓰루 음이온 교환 여과; rAAV 입자의 농축을 위한 접선 유동 여과(TFF); 아파타이트 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 헬퍼 바이러스의 열 불활성화; 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완충액 교환; 나노여과; 및 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획. 이들 단계는 단독으로, 다양한 조합으로, 또는 상이한 순서로 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 아래 기재된 순서로 모든 단계를 포함한다. rAAV 입자의 정제 방법은, 예를 들어, Xiao *et al.*, (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232; US 특허 번호 제 6,989,264호 및 제8,137,948호; 및 WO 2010/148143호에서 확인된다.

## [0088] V. 치료 방법

[0089] 본 개시의 일정 양태는 뮤코지질증 II형(ML II) 또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료하는 방법 또는 뮤코지질증 II형 또는 뮤코지질증 III형을 갖는 포유동물에서의 신체 크기를 증가, 골 무기질 함량을 증가, 또는 골 무기질 밀도를 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이들 방법은 GNPTAB의 AAV-매개 발현이 MLII의 증상, 예를 들어 골 성장 장애를 질환의 마우스 모델에서 완화시킬 수 있다는 본원에 기재된 발견에 부분적으로 기반한다. 상기 기재된 바와 같이, 두 질환은 GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제의 촉매 활성의 알파 및 베타 서브유닛을 인코딩하는 GNPTAB 유전자에서의 기능 상실 돌연변이에 의해 야기된다.

[0090] MLII는 GNPTAB에서의 돌연변이에 의해 야기되는 상염색체 열성 장애로 알려져 있다. GNPTAB 활성은 단백질에 만노스-6-포스페이트를 부가하고, 이에 의한 리소좀으로의 이동(trafficking)을 위해 단백질을 표지하는 데 필요하다. GNPTAB 활성의 부재 하에서, 리소좀 단백질(예를 들어, 리소좀 가수분해효소)은 대신 세포 외로 분비된다. 결과적으로, 정상적으로 리소좀 내에서 분해되는 물질, 예를 들어 글리코사미노그리칸, 지질, 및 올리고당류가 세포 내에 축적되어, 큰 봉입체의 존재를 유도한다. MLII는 현미경에 의해 확인 가능한 이들 봉입체(inclusion)-세포("I-세포")의 존재에 기인하여 I-세포병으로도 불려왔다. MLII의 증상은 종종 출생 직후에 나타나고, 골격 이상, 단신, 약한 근육 긴장, 근육 긴장 결핍(근육 긴장 저하), 탈장(예를 들어, 팽만된 복부, 배꼽 탈장), 고관절 탈구 및 관절 변형, 심장 비대, 승모관막 비대 및 기능 부전, 기도의 진행성 점막 비후, 거친

및/또는 격한 호흡, 잦은 호흡기 감염, 변비, 설사, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 및 발달 지연, 구체적으로는 언어 능력 및 운동 기술에서의, 인지 결핍을 포함할 수 있다. 이들 증상은 MLII 환자들을 악화시켜, 이들은 전형적으로 독립적으로 걸을 수 없고, 아동기를 넘겨서 생존하지 못한다.

[0091] MLII와 같이, MLIII는 GNPTAB에서의 돌연변이에 의해 야기되는 상염색체 열성 장애로 당분야에 공지되어 있다. 그러나, MLII와 비교하여, MLIII는 전형적으로 GNPTAB에서의 더 약한 기능 상실 돌연변이에 기인하며 이에 의해 더 가벼운 질환 표현형을 특징으로 한다. MLIII 증상은 3 내지 5 세까지 완전히 분명하지 않을 수 있고 심각도가 상당히 가변적이어서, 일부 환자는 60 세를 넘겨 사는 반면 다른 이들은 아동기를 넘겨서 생존하지 못한다. MLIII 증상은 전형적으로 골격 이상, 단신, 대동맥 판막 질환, 각막 혼탁, 가벼운 기관 폐대, 이동성 상실, 및 관절 이상을 포함한다. MLIII는 가성 후르러 다발성 이영양증으로도 불려왔다. 더욱 상세한 기재 및 MLII 및 MLIII 환자에서 발견되는 특이적인 돌연변이에 대해서는, 예를 들어, Paik, K.H., *et al.* (2005) *Hum. Mutat.* 26(4):308-14를 참고.

[0092] MLII 및 MLIII에 대한 다양한 진단 테스트가 당분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII는 혈청 샘플 또는 다른 환자 샘플(예를 들어, 피부 샘플 또는 배양된 섬유아세포) 내의 하나 이상의 리소좀 효소의 활성을 측정함으로써 진단될 수 있다. 혈청 내의 일정 리소좀 효소의 활성은 정상 환자에서보다 MLII 환자에서 5 내지 20 배 더 높을 수 있다. 유사하게, MLIII에서 이들 효소의 혈청 활성은 10 배까지 높아질 수 있다. 이들 효소는 비제한적으로 베타-D-헥소사미니다아제(EC code 3.2.1.52), 베타-D-글루쿠로니다아제(EC code 3.2.1.31), 베타-D-갈락토시다아제(EC code 3.2.1.23), 알파-L-푸코시다아제(EC code 3.2.1.51) 및 알파-D-만노시다아제(EC code 3.2.1.24)를 포함할 수 있다. 대조적으로, 배양된 섬유아세포에서 이들 활성은 결핍될 수 있다. 일부 구현예에서, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제 활성은 MLII 또는 MLIII를 진단하기 위하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자의 샘플이 정상 환자 샘플로부터의 활성에 비해 1% 미만의 N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제 활성을 나타내는 경우 ML II로 진단될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자의 샘플이 정상 환자 샘플로부터의 활성에 비해 1% 내지 10% 사이의 N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제 활성을 나타내는 경우, ML II로 진단될 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII는 돌연변이에 대하여 GNPTAB 유전자좌(예를 들어, 코딩 서열, 프로모터/인트론 서열, 또는 임의의 다른 제어 서열)를 시퀀싱하는 것에 의해 진단될 수 있다. ML II 및 ML III는 증가된 요 다당류 및/또는 요 글리코사미노글리칸을 또한 특징으로 할 수 있으나, 이들 증상은 MLII 및 MLIII에 특이적이지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII는 용모막 샘플 검사, 예를 들어, 영양막 생검에 의해 출생 전에 진단될 수 있다(예를 들어, Poenaru, L., *et al.* (1984) *Am. J. Hum. Genet.* 36(6):1379-85 참고). 상기 기재된 바와 같이, MLII에서 환자 샘플(예를 들어, 섬유아세포)로부터의 I-세포는 현미경에 의해서도 확인될 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII에 대한 치료(예를 들어, 본 개시의 유전자 치료 벡터)는 치료 효능에 대하여 테스트될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII에 대한 치료는 신장 증가 폭, 골 무기질 함량, 골 무기질, 밀도에서의 증가를 야기할 수 있거나, 본원에 기재된 MLII 및/또는 MLIII의 하나 이상의 증상의 완화를 야기할 수 있다. rAAV 투여의 효과는 본원에 기재된 몇몇의 기준에 의해 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법을 이용한 대상체에서의 치료 이후에, 대상체는 예를 들어, 질환 상태의 하나 이상의 징후 또는 증상의 진행에 있어서의 개선 및/또는 안정화 및/또는 지연에 대해 본원에 기재된 것들을 포함하는 하나 이상의 임상 파라미터에 의해 평가될 수 있다. 이러한 테스트의 예들은 당분야에 공지되어 있고, 주관적(예를 들어, 대상체 보고된)뿐만 아니라 객관적 측정도 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, GNPTAB의 발현은 치료 효능을 모니터링하기 위해 측정될 수 있다. GNPTAB 발현을 측정하는 것은 GNPTAB mRNA 및/또는 단백질 발현을 측정하는 것을 지칭할 수 있다. mRNA 및/또는 단백질 발현을 측정하는 다양한 방법이 당분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 qPCR, 노던 블롯팅, RNA-seq, 반정량적 PCR, 웨스턴 블롯팅, 질량 분광측정, ELISA 등을 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, 비제한적으로 베타-D-헥소사미니다아제(EC code 3.2.1.52), 베타-D-글루쿠로니다아제(EC code 3.2.1.31), 베타-D-갈락토시다아제(EC code 3.2.1.23), 알파-L-푸코시다아제(EC code 3.2.1.51) 및 알파-D-만노시다아제 (EC code 3.2.1.24)를 포함하는 하나 이상의 리소좀 효소의 활성은 치료 효능을 모니터링하기 위해 환자 샘플(예를 들어, 혈청 샘플)에서 측정될 수 있다. 혈청 내 리소좀 효소 활성의 감소는 효능을 나타낼 수 있다.

[0097] 일부 구현예에서, 관절 또는 사지 기능의 개선은 효능을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 언어 능력의 개선은

효능을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 운동 기능의 개선은 효능을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서 증가된 성장 속도(예를 들어, 신장 증가 폭에서의 증가)는 효능을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, 골 무기질 밀도, 골 무기질 함량 및/또는 성장(예를 들어, 신장)은 치료 효능을 모니터링하기 위해 평가될 수 있다. 신장 모니터링 방법은 당분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 골 무기질 밀도 및 골 무기질 함량을 모니터링하기 위한 테스트도(예를 들어, 골 밀도 측정 테스트) 당분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있고(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이) 비제한적으로 이중에너지 X선 흡수계측(DEXA) 스캔, 말초 이중에너지 X선 흡수계측(P-DEXA) 스캔, 이중 광자 흡수 계측(DPA), 및 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캔을 포함할 수 있다.

[0098] 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII에 대한 치료(예를 들어, 본 개시의 유전자 치료 벡터)는 동물 모델에서 테스트될 수 있다. MLII 및 MLIII에 대한 동물 모델은 당분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, MLII 및/또는 MLIII에 대한 치료는 마우스 모델, 예를 들어 본원의 실시예에 기재된 유전적으로 변형된 마우스 모델에서 테스트될 수 있다. 일부 구현예에서, MLII에 대한 치료는 MLII에 대한 고양이 모델에서 테스트될 수 있다(추가적 설명을 위해서는 Mazrier, H., *et al.* (2003) *J. Hered.* 94(5):363-73 or Bosshard, N.U., *et al.* (1996) *Vet. Pathol.* 33(1):1-13 참고).

[0099] 특정 rAAV 벡터 및 조성물의 선택은, 개인의 의료 병력 및 치료되는 상태 및 개체의 특징을 포함하나 이에 제한되지 않는 다수의 상이한 인자들에 의존한다. 이러한 특징의 평가 및 적절한 치료 요법의 설계는 궁극적으로 치방의사의 책임이다.

[0100] 일부 양태에서, 본 발명은 본 개시의 rAAV 입자 유효량을 투여함으로써 MLII 및/또는 MLIII를 치료하는 방법을 제공한다. rAAV는 특정한 관심 조직으로 투여될 수도 있고, 또는 전신 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 유효량은 비경구 투여될 수 있다. 비경구 투여 경로에는 비제한적으로 정맥내, 복강내, 골내, 동맥내, 뇌내, 근육내, 경막내, 피하, 뇌실내, 간내 등이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 유효량은 하나의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 유효량은 하나를 초과하는 투여 경로의 조합을 통해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 유효량은 하나의 위치에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 유효량은 하나를 초과하는 위치에 투여될 수 있다.

[0101] 치료 목적에 따라, rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태로)의 유효량이 투여된다. 예를 들어, 낮은 형질도입 백분율로 원하는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료 목적은 일반적으로 이 형질도입 수준에 부합하거나 이를 증가하는 것이다. 일부 경우에서, 이 형질도입 수준은 원하는 조직 유형 표적 세포의 단지 약 1 내지 5%, 일부 구현예에서 원하는 조직 유형 세포의 적어도 약 20%, 일부 구현예에서 적어도 약 50%, 일부 구현예에서 적어도 약 80%, 일부 구현예에서 적어도 약 95%, 일부 구현예에서 원하는 조직 유형 세포의 적어도 약 99%의 형질도입에 의해 달성될 수 있다. rAAV 조성물은 동일한 절차 동안 또는 수 일, 수 주, 수 개월, 또는 수 년 떨어져서, 1회 이상의 투여에 의해 투여될 수 있다. 본원에 기재된 하나 이상의 임의의 투여 경로가 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 다수의 벡터가 인간을 치료하기 위해 이용될 수 있다.

[0102] AAV 바이러스 입자에 의해 형질도입된 세포를 확인하는 방법은 당분야에 공지되어 있다; 예를 들어, 면역조직화학 또는 증강된 녹색 형광 단백질과 같은 마커의 이용은 바이러스 입자, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 rAAV 캡시드를 포함하는 바이러스 입자의 형질도입을 검출하기 위해 이용될 수 있다.

[0103] 일부 구현예에서 유효량의 rAAV 입자는 동시에 또는 순차적으로 하나를 초과하는 부위에 투여된다. 일부 구현예에서, 유효량의 rAAV 입자는 단일 부위에 1 회를 초과하여(예를 들어, 반복하여) 투여된다. 일부 구현예에서, rAAV 바이러스 입자의 다회 주사는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간 또는 24 시간 이하로 떨어져 있다.

[0104] 치료 목적에 따라, rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태로)의 유효량이 투여된다. 예를 들어, 낮은 형질도입 백분율로 원하는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료 목적은 일반적으로 이 형질도입 수준에 부합하거나 이를 증가하는 것이다. 일부 경우에서, 이 형질도입 수준은 원하는 조직 유형 표적 세포의 단지 약 1 내지 5%, 일부 구현예에서 원하는 조직 유형 세포의 적어도 약 20%, 일부 구현예에서 적어도 약 50%, 일부 구현예에서 적어도 약 80%, 일부 구현예에서 적어도 약 95%, 일부 구현예에서 원하는 조직 유형 세포의 적어도 약 99%의 형질도입에 의해 달성될 수 있다. rAAV 조성물은 동일한 절차 동안 또는 수 일, 수 주, 수 개월, 또는 수 년 떨어져서, 1회 이상의 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다수의 벡터가 포유동물(예를 들어, 인간)을 치료하기 위해 이용될 수 있다.

- [0105] 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 조성물은 인간으로의 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 조성물은 소아 투여를 위해 사용될 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, ML II 및 ML III의 증상 중 많은 것이 사실상 발달적이므로(예를 들어, 성장, 사지, 및 관절 결함; 언어 능력 및 운동 지연), ML II 및/또는 ML III를 가능한 한 생의 초기에 치료하는 것이 특히 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태로)는 1 개월 미만, 2 개월 미만, 3 개월 미만, 4 개월 미만, 5 개월 미만, 6 개월 미만, 7 개월 미만, 8 개월 미만, 9 개월 미만, 10 개월 미만, 11 개월 미만, 1 년 미만, 13 개월 미만, 14 개월 미만, 15 개월 미만, 16 개월 미만, 17 개월 미만, 18 개월 미만, 19 개월 미만, 20 개월 미만, 21 개월 미만, 22 개월 미만, 2 년 미만 또는 3 년 미만 연령의 환자에게 투여된다.
- [0106] 일부 구현예에서, 본 개시의 rAAV 조성물은 청년으로의 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유효량의 rAAV(일부 구현예에서 입자의 형태로)는 12 세 미만, 13 세 미만, 14 세 미만, 15 세 미만, 16 세 미만, 17 세 미만, 18 세 미만, 19 세 미만, 20 세 미만, 21 세 미만, 22 세 미만, 23 세 미만, 24 세 미만 또는 25 세 미만 연령의 환자에게 투여된다.
- [0107] **VI. 키트 또는 제조품**
- [0108] 본원에 기재된 rAAV 벡터, 입자, 및/또는 약학적 조성물은, 예를 들어, 본원에 기재된 발명의 방법 중 하나에서 사용하기 위해 설계된 키트 또는 제조품 내에 함유될 수 있다.
- [0109] 일반적으로, 시스템은 본 발명의 방법에서의 사용에 적합한 캐놀라, 하나 이상의 시린지(예를 들어, 1, 2, 3, 4 이상), 및 하나 이상의 유체(예를 들어, 1, 2, 3, 4 이상)를 포함한다.
- [0110] 시린지는 유체의 전달을 위한 캐놀라와 연결될 수 있다면, 임의의 적절한 시린지일 수 있다. 일부 구현예에서, 시스템은 하나의 시린지를 가진다. 일부 구현예에서, 시스템은 2 개의 시린지를 갖는다. 일부 구현예에서, 시스템은 3 개의 시린지를 갖는다. 일부 구현예에서, 시스템은 4 개 이상의 시린지를 갖는다. 본 발명의 방법에서의 사용에 적합한 유체는 본원에 기재된 것들, 예를 들어, 각각 본원에 기재된 하나 이상의 벡터의 유효량을 포함하는 하나 이상의 유체, 및 하나 이상의 치료제를 포함하는 하나 이상의 유체를 포함한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 키트는 단일 유체(예를 들어, 벡터의 유효량을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 유체)를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 2 개의 유체를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 3 개의 유체를 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 4 개 이상의 유체를 포함한다. 유체에는 본 개시의 rAAV 벡터 조성물의 전달, 희석, 안정화, 완충, 또는 다르게는 수송에 적합한 본원에 기재되거나 당분야에 공지된 희석제, 완충제, 부형제, 또는 임의의 다른 액체가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 하나 이상의 완충제, 예를 들어 수성 pH 완충 용액을 포함한다. 완충제의 예에는 비제한적으로 포스페이트, 시트레이트, Tris, HEPES, 및 다른 유기산 완충제가 포함될 수 있다.
- [0112] 일부 구현예에서, 키트는 용기를 포함한다. 적합한 용기에는, 예를 들어, 바이알, 벡, 시린지, 및 병이 포함될 수 있다. 용기는 유리, 금속, 또는 플라스틱과 같은 하나 이상의 물질로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 용기는 본 개시의 rAAV 조성물을 수용하기 위해 이용된다. 일부 구현예에서, 용기는 또한 유체 및/또는 다른 치료제를 수용할 수 있다.
- [0113] 일부 구현예에서, 키트는 본 개시의 rAAV 조성물과 함께 추가적인 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 동일한 용기 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 상이한 용기 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 동시에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물 및 추가적인 치료제는 동일한 날에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV 조성물은 추가적인 치료제의 투여의 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 2 주, 3 주, 4 주, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 또는 6 개월 내에 투여될 수 있다.
- [0114] 일부 구현예에서, 키트는 AAV 투여 전에 면역 시스템을 일시적으로 억제하기 위한 치료제를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 AAV 입자에 대한 T 세포 반응을 저해하기 위해서 바이러스 주사 직전 및 직후 일시적으로 면역 억제된다(예를 들어, Ferreira *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 25:180-188, 2014 참고). 일부 구현예에서, 키트는 사이클로스포린, 미코페놀레이트 모페틸, 및/또는 메틸프레드니솔론을 추가로 제공한다.
- [0115] 본 발명의 rAAV 입자 및/또는 조성물은 사용을 위한 설명서를 포함하는 키트로 추가로 포장될 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 rAAV 입자 조성물의 전달(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 유형의 비경구 투여)을 위한 장치



를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사용을 위한 설명서에는 본원에 기재된 방법 중 하나에 따른 설명서가 포함된다. 일부 구현예에서, 설명서는 용기와 함께 제공되는(예를 들어, 이에 고정되는) 라벨 상에 인쇄된다. 일부 구현예에서, 사용을 위한 설명서에는, 예를 들어, 뮤코지질증 II형(ML II) 및/또는 뮤코지질증 III형(ML III)을 치료, 신체 크기를 증가, 골 무기질 함량을 증가, 및/또는 골 무기질 밀도를 증가시키기 위해 유효량의 rAAV 입자를 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여하기 위한 설명서가 포함된다.

[0116] **VII. 동물 모델**

[0117] 본 발명은 뮤코지질증 II의 동물 모델을 제공한다. GNPTAB 돌연변이 마우스는 표준 방법을 이용하여 배아 줄기(ES) 세포 클론을 숙주 배반포 내로 미세주사하는 것에 의해 생성될 수 있다. 간략하게, 마우스 GNPTAB 유전자 좌의 표적 파괴(예를 들어, 엑손 12부터 엑손 20까지 결실)는 리포터 또는 선택 마커 유전자를 함유하는 대체 벡터와의 상동 재조합에 의해 수행될 수 있다. 모든 자손은 꼬리 스닙(tail snip) DNA에서의 중합효소 연쇄 반응 분석에 의해 유전자형 분석되었다. 이 연구에서 사용된 모든 마우스는 야생형(+/+) 마우스 또는 이형접합체(+/-) 또는 동형접합체(-/-)로 확인된 수컷이었다. 일부 구현예에서, GNPTAB의 적어도 하나의 대립유전자는 엑손 12와 엑손 20 사이에 위치한 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB의 적어도 하나의 대립유전자는 엑손 12와 엑손 20에 걸친 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 결실은 엑손 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 중 하나 이상의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, GNPTAB 유전자의 일부분은 리포터 및/또는 선택 마커를 인코딩하는 유전자에 의해 대체된다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 네오마이신에 대한 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 동물은 포유동물이다(예를 들어, 설치류, 토끼, 고양이, 개, 돼지, 원숭이). 일부 구현예에서, 포유동물은 설치류이다(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그). 일부 구현예에서 동물은 면역적격 또는 면역결핍이다. 일부 구현예에서, 동물 모델은 유전적으로 변형된 동물을 포함한다. ML II의 다른 마우스 모델은 Gelfman *et al.*, (*Invest. Optham. Visual Sci.* 2007, 48:5221-5228) 및 Paton, L. *et al.*, (*J Biol Chem.* 2014, 289(39):26709-21)에 의해 제공된다.

[0118] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 동물 모델에 제제를 투여하는 것을 포함하는 뮤코지질증 II(ML II)의 치료를 위한 제제를 평가하는 방법으로서, ML II의 하나 이상의 증상의 완화는 제제가 ML II의 유익한 치료를 제공할 수 있다는 것을 나타내는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, ML II의 증상은 체중 감소, 골 밀도 감소, 골 무기질 함량 감소, 골격 결함, 인지 결핍, 대근육 및 소근육 운동 기술의 발달 지연, 난청, 근육 긴장 결핍, 팽만된 복부, 배꼽 탈장, 기도의 진행성 점막 비후, 잦은 호흡기 감염, 승모판막 비대 및 기능 부전, 변비 및/또는 설사이다. 일부 구현예에서, 제제는 저분자, 폴리펩티드, 항체, 핵산 또는 재조합 바이러스 입자이다.

[0119] **실시예**

[0120] 본 발명은 하기 실시예를 참조로 하여 더욱 충분히 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원에 기재된 실시예 및 구현예는 단지 예시 목적을 위한 것으로, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 암시될 것이고, 본 출원의 사상 및 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함될 것임이 이해된다.

[0121] **실시예 1: GNPTAB 녹아웃 마우스의 생성 및 특성 표시**

[0122] 뮤코지질증 II형(ML II형 또는 ML-II, I-세포병으로도 알려짐; OMIM 엔트리 #252500)은 N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라제(GNPTAB)의 결핍에 의해 야기된 상염색체 열성 리소좀 축적 장애이다. 섬유아세포의 세포질 내 많은 봉입체의 존재, 뮤코다당뇨증(mucopolysacchariduria) 부족, 혈청 내 리소좀 효소 활성 증가, 및 GlcNAc-포스포트랜스퍼라제 활성 감소가 이 질환의 특징이다. ML II형의 병리학을 연구하기 위하여, GNPTAB 녹아웃(KO) 마우스를 개발하고 특성 표시하였다.

[0123] **방법**

[0124] **AAV2/8-GNPTAB 작제물의 생성**

[0125] Genescript (Piscataway, NJ, USA)에 의해 마우스 GNPTAB의 코딩 서열을 증폭하고 마우스에서의 발현을 위하여 코돈-최적화하였다. GNPTAB cDNA의 큰 크기 및 AAV의 제한된 용량 때문에, cDNA는 이용 가능한 어느 벡터에도 들어맞지 않는다. 따라서, 단축된 형태의 CMV 인핸서 및 닭 베타-액틴 프로모터뿐만 아니라 매우 작은 인트론도 함유하는 신규한 발현 카세트를 설계하였다. 시험관내에서의 HEK293 세포의 일시적 감염 후 정량적 RT-PCR함으로써 전장 GNPTAB mRNA의 발현을 확인하였다. 이 AAV2/8-GNPTAB를 정제, -70℃에서 보관하고, 2.5x10<sup>12</sup> DNase 내성 입자/mL의 농도로 사용하였다. 단축된 인핸서 및 프로모터 서열을 이들 연구를 위하여 사용하였다.

- [0126] **동물**
- [0127] GNPTAB 돌연변이 마우스는 표준 방법을 이용하여 배아 줄기(ES) 세포 클론을 숙주 배반포 내로 미세주사함으로써 생성하였다. 간략하게, 마우스 GNPTAB 유전자좌의 표적 파괴(엑손 12부터 엑손 20까지 결실)는 네오마이신-내성 유전자를 함유하는 대체 벡터와 상동 재조합함으로써 수행하였다. 이 연구에서 사용된 마우스는 혼합된 유전적 배경을 가졌다(129/Sv 및 C57BL/6). 모든 자손에 대해 꼬리 스닙 DNA에서의 중합효소 연쇄 반응 분석을 함으로써 유전자형 분석하였다. 이 연구에서 사용된 모든 마우스는 야생형(+/+) 마우스 또는 이형접합체(+/-) 또는 동형접합체(-/-)로 확인된 수컷이었다.
- [0128] 마우스는 12 시간 명암 주기 하에서 콜로니 룸 내에 케이지 당 2 내지 5 마리 무리로 수용하였다. 설치류 식사(Harlan Teklad #8604, Madison, WI, USA) 및 물은 자유롭게(*ad libitum*) 이용 가능하였다. 동물 보호는 *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*(National Academy Press, Washington DC, 1996)에 기재된 가이드라인에 따라 수행하였다.
- [0129] **백터 주사**
- [0130] 6 주령 GNPTAB KO 마우스에 PBS 또는 AAV-GNPTAB를 단회 양측 i.v. 주사하였다. PBS를 주사한 야생형 또는 이형접합체 마우스 군이 대조군 역할을 하였다. AAV-GNPTAB를 주사한 각 마우스는  $3 \times 10^{11}$  벡터 입자를 받았다. 면역 반응을 감소 또는 제거하기 위해, Halbert *et al.*, (1998) *J. Virol.* 72:9795-9805에 의한 프로토콜에 따라 항-CD40 리간드 항체(MR1)를 단독으로 주사하였다.
- [0131] **발육학(Auxology)**
- [0132] 모든 마우스를 전자 디지털 캘리퍼스(caliper)를 이용하여 총 체중(g) 및 신체 길이(코부터 항문까지 거리, mm)를 측정함으로써 매주 검사하였다.
- [0133] **조직학**
- [0134] 10 개월령의 야생형 및 GNPTAB<sup>-/-</sup> 마우스에 진정제를 투여하고 심장을 통해 PBS로 관류시켰다. 관류 후, 대퇴골을 제거, 4% 파라포름알데히드(PFA)에 고정, 0.5 M EDTA로 칼슘 제거하고, 파라핀에 포매하였다. 대퇴골 절편(4  $\mu$ M)을 헤마톡스린-에오신으로 염색하였다. 4℃에서의 슬라이드의 스캐닝 및 분석을 위해 Aperio ScanScope AT (v101.0)를 사용하였다. TEM 또는 헤마톡실린 및 에오신(H&E)용으로 조직을 포매하고 절단하였다.
- [0135] **초미세구조적 분석**
- [0136] 야생형 및 KO 마우스의 목을 자르고, 침샘을 제거하고 4℃에서 하룻밤 동안 PBS 중 2.5% 글루타랄데히드에 침수 시킴으로써 고정하였다. 침샘을 탈수시키고 이후 PBS 완충제에서 추가 30 분 동안 세척한 후 실온에서 1 시간 동안 1% 오스뮴 테트록사이드로 후고정하였다. 연속 다단계 알코올(graded alcohol series)을 통해 시료를 탈수시키고 Epon 812에 포매하였다. 2.5  $\mu$ M에서 연속 반-박편(Semi-thin serial section)으로 절단하고(Leica ultracut UCT), 톨루이딘 블루로 염색하고 광학 현미경 하에서 관찰하였다. 투과 전자 현미경 관찰은 Mirgagni 현미경(FEI)으로 수행하였다.
- [0137] **리소솜 효소 분석**
- [0138] 혈액을 채취하여 샘플을 15 분 원심분리(8000 xg)하고 혈장을 -70℃에서 보관하였다. 혈장 리소솜 효소 활성을 기관[Department of Chemical Pathology, Samsung Medical Center, South Korea]에서 측정하였다. ML II에서는, 특정 GlcNAc-포스포트랜스퍼라제 활성을 측정할 수 없었다. 따라서, 증가된 혈장 리소솜 효소에 기반하여 진단을 하였다.
- [0139] **DEXA 분석**
- [0140] 마취된 마우스에서 pDEXA Sabre X-ray 골 밀도측정기로 골 무기질 밀도(BMD), 골 무기질 함량(BMC), 및 제지방 질량을 측정하였다. 마취를 투여한 후, 각 마우스의 체중을 기록하고, 이후 마우스를 DEXA 스캐너에 배치하였다. 데이터 분석을 위하여, 마우스의 전신을 포함하는 영역을 정의하였다.
- [0141] **실시간 PCR**
- [0142] GNPTAB의 mRNA 수준을 정량하기 위하여, ABI PRISM 7900HT 시스템 및 TaqMan 유전자 발현 분석(Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 실시간 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. mRNA 수준은 GAPDH 수준

에 비례하여 표현하였다. SDS2.3 소프트웨어(Applied Biosystems)를 이용한 데이터를 분석하기 위해  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법을 사용하였다.

[0143] **통계 분석**

[0144] 통계 분석 및 도면 및 표 작성을 위해 GraphPad Prism Version 5를 사용하였다. 차이의 유의성은 독립 표본 스튜던트 t-검정(unpaired Student's *t*-test), 일원 분산 분석 검정(one-way ANOVA test)를 통해 결정하였다. 달리 특정되지 않는 한, 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표현된다.

[0145] **결과**

[0146] GNPTAB KO 마우스를 생성하기 위하여 유전자 트랩 전략을 사용하였다. 도 1a에서 나타난 바와 같이, 마우스를 생성하기 위하여 엑손 12와 20 사이에서 네오마이신-내성 유전자를 함유하는 대체 벡터와의 상동 재조합을 이용하였다. 도 1b에서 나타난 바와 같이, ES 클론의 GNPTAB 유전자 내 유전자 트랩의 존재를 서던 블롯팅 분석을 통해 확인하였다.

[0147] 야생형, 이형접합체, 및 동형접합체 동물에 대해 포괄적 표현형 분석을 수행하였다. KO 마우스는 그들의 작은 크기에 의해 야생형(WT) 한 배 새끼들로부터 시각적으로 구별될 수 있다. 평균 체중(도 2a) 및 길이(도 2b)는 KO 마우스에서 유의미하게 감소되었다. 그들의 작은 크기와 일관되게, 동형접합체 마우스는 거친 안면 형태를 나타내었다(도 2c).

[0148] 도 3a에서 나타난 바와 같이, 정상 연골에서는, 선명한 열공 공간이 연골세포를 둘러싸고 있었다. 세포질은 단일의 선명한 공포를 함유하였다. KO 마우스에서는, 대퇴부 연골세포가 현저하게 비대했고, 그의 팽대된 열공(lacunae)을 완전히 채웠다(도 3b). 비대 연골세포의 세포질은 부족한 양의 미립의 양염색성 물질을 함유하는 풍부한 미세 공포에 의해 팽창되었다. 연골세포의 고정-관련 수축이 더 적었고, 이는 팽대된 열공을 채웠다. 이는 단일의 큰, 선명한 공포를 함유하고 열공을 부분적으로만 채웠던 야생형 연골세포와 대조된다.

[0149] 점액성 유형 및 장액성 유형 분비 세포로 구성된 외분비 침샘 파리는 광학 현미경으로 검사할 때 KO 마우스에서 광범위한 공포 형성을 나타냈다(Gelfman *et al.*, 2007, *Invest. Optham. Visual Sci.* 48:5221-5228). 기저를 이루는 병리학에의 통찰력을 얻기 위해, 턱밑 침샘을 전자 현미경(EM)으로 분석하였다.

[0150] 점액성 유형 및 장액성 유형 분비 세포 둘 다 야생형 마우스에서 쉽게 관찰되었다(도 4a 내지 도 4c). 그와 대조적으로, KO 마우스의 턱밑 침샘의 전반적 구조는 아주 심하게 파괴되어 EM 절편 내 장액성 세포의 확인을 매우 방해하였다(도 4d 내지 도 4f). 점액성 유형 분비 세포는 불균일 물질을 함유하는 큰 막-결합 공포로 패키징되어 있었다(도 4e, 도 4f). 큰 공포는 KO 점액성 세포 내에 축적된 분해되지 않은 세포질 물질로 채워졌고 단일 막에 의해 둘러싸여 있었다. 이들 관찰은 이들이 리소좀과 자가포식 구획의 융합에 의해 형성된 자가리소좀에 해당할 가능성이 있음을 보여준다.

[0151] 이들 효소를 리소좀으로 제대로 표적하기 위하여 필수적인 만노스-6-포스페이트 인식 마커를 합성할 수 없기 때문에, ML-II 환자는 매우 상승된 혈청 내 리소좀 효소 수준을 가진다. 이 이동 결합은 효소의 혈액 내 과다 분비를 야기한다. 도 5a 내지 도 5d는 야생형 마우스와 비교하여 KO 마우스가 매우 증가된 수준의 리소좀 효소, 예를 들어 N-아세틸글루코사미니다아제(도 5a),  $\beta$ -헥소사미니다아제 A (도 5b),  $\beta$ -갈락토시다아제(도 5c), 및  $\beta$ -글루쿠로니다아제(도 5d)를 나타냄을 보여준다. 이 표현형은 인간에서의 관찰과 일관되게, 동형접합체 마우스에서 GlcNAc-1-포스포트랜스퍼라제 활성화에 결함이 있는 경우 예상될 것이다.

[0152] 요약하면, 이들 실험은 GNPTAB KO 마우스가 야생형 마우스에 비해, 특히 성장, 침샘 형태학, 및 리소좀 효소 수준에 대해 분명한 표현형 차이를 보였다는 것을 입증한다. 이들 결과는 GNPTAB KO 마우스가 ML-II에 대한 치료적 처리를 연구하기 위한 모델 시스템에 해당한다는 것을 보여준다.

[0153] **실시예 2: GNPTAB KO 마우스에서 GNPTAB의 AAV-매개 투여에 대한 평가**

[0154] ML-II 환자는 성장 지체를 나타내기 때문에, 이 연구의 주요 목표는 ML-II 모델에서 성장을 촉진할 수 있는 AAV-매개 GNPTAB 투여의 효능을 평가하는 것이었다. 따라서, AAV-GNPTAB으로 주사된 GNPTAB KO 마우스에 대비하여, 야생형, GNPTAB 이형접합체, 및 GNPTAB KO 마우스의 표현형을 분석하였다.

[0155] 도 6a 및 도 6b에서 나타난 바와 같이, 모든 분석적 평가는 주사 후 두 기간 동안 수행하였다: 첫 번째는 주사 후 16 주에 시작하였고(12 주령에), 두 번째는 주사 후 32 주에 시작하였다(38 주령에). 발육학적 분석을 주사 후 6 주에 추가하였다.

[0156] CMV 인핸서/CBA 프로모터 및 BGH polyA 신호에 의해 조절되는 마우스 GNPTAB cDNA를 발현하는 발현 카세트를 함유하는 플라스미드를 구축하였다(도 7a). 전장 GNPTAB가 본원에 기재된 단축된 CMV 인핸서/CBA 프로모터의 제어 하에 있었다. AAV2/8-GNPTAB로 주사된 GNPTAB KO 마우스로부터의 간에 대한 정량적 실시간 PCR 분석은 AAV-GNPTAB의 특이적이고 높은 발현을 보여준다. 예상대로, 대조군 한 배 새끼로부터의 샘플에서는 임의의 AAV-GNPTAB mRNA가 부재했다(도 7b).

[0157] AAV-매개 유전자 전달이 생리적으로 관련있는 방식으로 대사에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위한 초기 테스트로서, 주사 후 32 주 동안 체중 증가를 모니터링하였다. 도 8a에서 나타난 바와 같이, KO 마우스에서는 AAV-GNPTAB의 처리에 대한 효과가 관찰되지 않았다. 도 8b는 체중 증가의 면에서 대조군 및 AAV-GNPTAB 처리 KO 마우스 사이에 관찰된 차이가 없었음을 보여준다.

[0158] 다음으로, KO 마우스의 왜소증 표현형을 약화시키는 효과를 평가하였다. 신체 크기에서의 증가를 보여주며, AAV-GNPTAB 주사된 KO 마우스에서 6주의 치료 후 왜소증에서의 개선이 주목되었다(도 9a, 도 9b 및 하기 표 1).

표 1

신장 변화

유전자형	시작 신장 (mm)	신장 증가 비율 (표시된 간격 후 신장/시작 신장)	
		6 주 후 신장	32 주 후 신장
야생형(+/+)	84.31±0.885	1.06±0.011	1.11±0.008
이형접합체(+/-)	84.83±0.475	1.07±0.008	1.11±0.005
GNPTAB 녹아웃(-/-)	76.09±2.483	1.04±0.012	1.09±0.015
GNPTAB 녹아웃(-/-) + AAV-GNPTAB	75.10±1.964	1.07±0.009	1.11±0.017

기술된 값은 평균±SEM이다.

[0159]

[0160] 다음으로, 골 무기질 밀도(BMD), 골 무기질 함량(BMC), 및 신체 조성을 측정하였다. DEXA는 골 무기질 및 신체 조성(체지방 질량으로서) 결정을 위한 X-선 기반 영상 기술이다. AAV-GNPTAB 전달은 AAV 주사된 KO 마우스에서 BMC 및 BMD의 상대적 증가를 유도하였다. 도 10a 내지 도 10c는 주사 전 획득된 BMD 원(raw) 데이터(도 10a) 및 주사 전후 비교된 BMD에서의 상대적 비율(도 10b, 10c)을 보여준다. 이들 데이터는 하기 표 2에서도 제공된다. 이들 결과는 골 무기질 밀도에 대한 유전자 전달의 유의미한 효과를 입증한다.

표 2

골 무기질 밀도(BMD) 변화

유전자형	시작 BMD (g/cm <sup>2</sup> )	신장 증가 비율 (표시된 간격 후 신장/시작 신장)	
		16 주 후 BMD	32 주 후 BMD
야생형(+/+)	0.055±0.001	1.139±0.017	1.124±0.032
이형접합체(+/-)	0.056±0.001	1.137±0.016	1.140±0.007
GNPTAB 녹아웃(-/-)	0.050±0.002	1.156±0.011	1.157±0.012
GNPTAB 녹아웃(-/-) + AAV-GNPTAB	0.048±0.001	1.219±0.013	1.236±0.044

기술된 값은 평균±SEM이다.

[0161]

[0162] 유사하게, 골 무기질 함량(BMC) 원(raw) 데이터는 강력한 유전자 치료 효과를 보여준다(도 11a). 비율 데이터(도 11b, 도 11c) 역시 골 성장에 있어서의 유의미한 효과에 근접한다. 이들 데이터는 하기 표 3에서도 제공된다.



표 3

골 무기질 함량(BMC) 변화

유전자형	시작 BMD (g/cm <sup>2</sup> )	신장 증가 비율 (표시된 간격 후 신장/시작 신장)	
		16 주 후 BMD	32 주 후 BMD
야생형(+/+)	0.575±0.016	1.172±0.047	1.123±0.073
이형접합체(+/-)	0.565±0.018	1.197±0.045	1.116±0.042
GNPTAB 녹아웃(-/-)	0.448±0.027	1.272±0.044	1.228±0.049
GNPTAB 녹아웃(-/-) + AAV-GNPTAB	0.386±0.016	1.560±0.080	1.551±0.096

기술된 값은 평균±SEM이다.

[0163]

[0164]

다음으로, DEXA 스캐너를 이용한 신체 제지방 함량(body lean content)의 분석은 KO 마우스에서 제지방 질량 또한 감소하였음을 밝혔다(도 12a). 도 12b에서 나타난 바와 같이, 주사 후 32 주에, 대조군 마우스는 주사 전 데이터에 비하여 제지방 질량 백분율에서의 유의미한 감소를 나타냈다. 그러나, AAV-GNPTAB 처리된 KO 마우스에서는 제지방 질량에서의 유의미한 변화가 관찰되지 않았다. 이들 데이터는 하기 표 4에서도 제공된다.

표 4

제지방 질량 백분율에서의 변화

유전자형	시작	32 주 후
	% 제지방 질량	% 제지방 질량
야생형(+/+)	86.56±0.627	78.98±3.425
이형접합체(+/-)	87.44±0.321	69.5±3.429
GNPTAB 녹아웃(-/-)	85.86±0.548	70.2±3.313
GNPTAB 녹아웃(-/-) + AAV-GNPTAB	84.3±0.665	84.7±0.7087

기술된 값은 평균±SEM이다.

[0165]

[0166]

요약하면, GNPTAB KO 마우스는, 인간 ML II형의 경우와 같이, 잘 자라지 못하였고 약한 골 밀도를 가졌다. 이 모델을 사용하여 AAV 벡터를 이용한 유전자 치료의 ML II형의 치료를 위한 잠재력을 검사하였다. 과발현된 GNPTAB은 KO 마우스에서 골 성장 장애를 부분적으로 방어하는 것으로 밝혀졌다. 전체적으로 보아, AAV 벡터를 통한 GNPTAB의 전신 전달은 매우 효율적이었고 ML II 형에서의 골 병리학의 교정을 위한 유망한 접근에 해당한다.

[0167]

서열

[0168]

달리 언급되지 않는 한 모든 폴리펩티드 서열은 N-말단에서 C-말단으로 제시된다.

[0169]

달리 언급되지 않는 한 모든 핵산 서열은 5'에서 3'으로 제시된다.

[0170]

GNPTAB

[0171] 인간 GNPTAB 단백질 서열 (SEQ ID NO:1)

MLFKLLQRQTYTCLSHRYGLYVCFLGVVVTIVSAFQFGEVVLEWSRDQYHVLFDSDYRDNIAGKSFQNRRLC  
 LPMPIDVVYTWVNGTDLELLKELQQVREQMEEEQKAMREILGKNTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV  
 LDPALPANITLKDLPSPYSPFHSASDIFNVAKPKNPSTNVSVVVFDTKDVEDAHSGLLKGNRQTVWRG  
 YLTTDKKEVPGVLVLMQDLAFLSGFPPTFKETNQLKTKLPENLSSKVLLQLYSEASVALLKLNNPKDFQEL  
 NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLAISQSKQDEDISASRFEDNEELRYSLSIERHAPWVRNIFIVT  
 NGQIPSWNLNDNPRVTIVTHQDVFRNLSHLPTFSSPAIESHIHRIEGLSQKFYLNDDVMFGKDVWPDDF  
 YSHSKGQKVYLTWPVFNCAEGCPGSGWIKDGYCDKACNNSACDWDGGDCSGNSGGSRYIAGGGGTGSGVVG  
 QPWQFGGGINSVSYCNQGCANSWLADKFCQACNVLSGCFDAGDCGQDHFHELYKVILLPNQTHYIIPKG  
 ECLPYFSFAEVAKRGVGAYSDNPIIRHASIANKWKT IHLIMHSGMNATTIHFNLTFQNTNDEEFKMQIT  
 VEVDTREGPKNLSTAQGYENLVSPITLLPEAEILFEDIPKEKRFKPKRHDVNSTRRAQEEVKIPLVNI  
 SLLPKDAQLSLNTLDLQLEHGDITLKGYNLSKSALLRSFLMNSQHAKIKNQAIITDETNDLSLVAPQEKQV  
 HKSILPNSLGVSERLQRLTFPAVSVKVNGHDQGNPPLDLETTARFRVETHQKTIIGNVTKEKPPSLIV  
 PLESQMTKEKKITGKEKENSMEENAENHIGVTEVLLGRKLQHYTDSYLGFLPWEKKKYFQDLLDEEESL  
 KTQLAYFTDSKNTGRQLKDTFADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAMPHMIDRIVMQELQDMFPEEFDKT  
 SFHKVRHSEDMQFAFSYFYLMQSAVQPLNISQVFDEVDTDQSGVLSGREIRTLATRIHELPLSLQDLTGL  
 EHMLINCSKMLPADITQLNNIPTQESYYDPNLPPVTKSLVTNCKPVTDKIHKAYKDKNKYRFEIMGEEE  
 IAFKMIRTNVSHVVGQLDDIRKNPRKRVCLNDNIDHNHKAQTVKAVLRDFYESMFP IPSQFELPREYRN  
 RFLHMHLEQEWRAIRDKLKFWTHCVLATLIMFTIFSFFAEQLIALKRKIFPRRIHKEASPNRIRV

[0172]

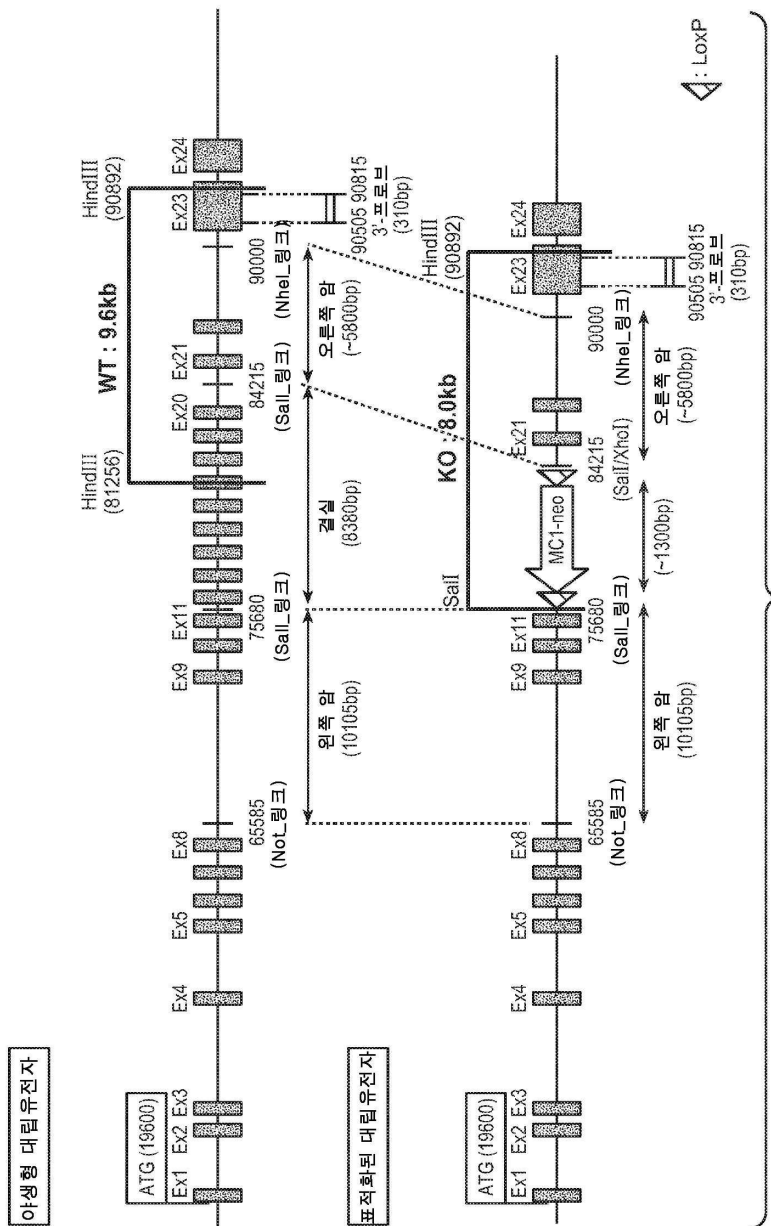
[0173] 마우스 GNPTAB 단백질 서열 (SEQ ID NO:2)

MLLKLQRQTYTCLSHRYGLYVCVGVVVTIVSAFQFGEVVLEWSRDQYHVLFDSDYRDNIAGKSFQNRRLC  
 LPMPIDVVYTWVNGTDLELLKELQQVREHMEEEQAMRETLGKNTEPTKKSEKQLECLLTHCIKVPMLV  
 LDPPLPANCTLKDLPYSPFHAASDMFNVAKPKNPSTNVSVVVFDTTKDVEDAHAGPFGGSKQMVWRA  
 YLTTDKKEAPGLVLMQDLAFLSGFPPTFKETSQLKTKLPEKLSSKIKLLRLYSEASVALLKLNNPKGFQEL  
 NKQTKKNMTIDGKELTISPAYLLWDLAISQSKQDEEDVSASRFEDNEELRYSLSIERHAPWVRNIFIVT  
 NGQIPSWNLNDNPRVTIVTHQDIFQNLSHLPTFSSPAIESHIHRIEGLSQKFYLNDDVMFGKDVWPDDF  
 YSHSKGQKVYLTWPVFNCAEGCPGSGWIKDGYCDKACNNSACDWDGGDCSGNTAGNRVAGGGGTGNIGAG  
 QHWQFGGGINTISYCNQGCANSWLADKFCQACNVLSGCFDAGDCGQDHFHELYKVTLNPNQTHYVVPKG  
 EYLSYFSFANIARRGVEGTYSNPIIRHASIANKWKT IHLIMHSGMNATTIYFNLTQONANDEEFKIQIA  
 VEVDTREAPKNLSTTQKAYESLVSPVTPLPQADVFPFEDVPKEKRFKPKRHDVNATGRFQEEVKIPRVNI  
 SLLPKAQVRLSNLDLQLERGDITLKGYNLSKSALLRSFLGNSLDTKIKPQARTDETGNLEVPQENPSH  
 RRPHGFAHEHRSEWTAPAETVTVKGRDHALNPPPVLETNARLAQPTLGVTVSKENLSPLIVPPESHLPK  
 EESDRAEGNAVPVKELVPGRRLLQQNYPGFLPWEKKKYFQDLLDEEESLKTQLAYFTDSKHTGRQLKDTF  
 ADSLRYVNKILNSKFGFTSRKVPAMPHMIDRIVMQELQDMFPEEFDKTSFHKVRHSEDMQFAFSYFYLL  
 MSAVQPLNISQVFHEVDTDQSGVLSGREIRTLATRIHDLPLSLQDLTGLEHMLINCSKMLPANITQLNNI  
 PPTQEAYYDPNLPPVTKSLVTNCKPVTDKIHKAYKDKNKYRFEIMGEEEIAFKMIRTNVSHVVGQLDDIR  
 KNPRKFVCLNDNIDHNHKAQTVKAVLRDFYESMFP IPSQFELPREYRNRLHMHLEQEWRAIRDKLKFW  
 THCVLATLIIFTIFSFFAEQIIALKRKIFPRRIHKEASPDRIIV

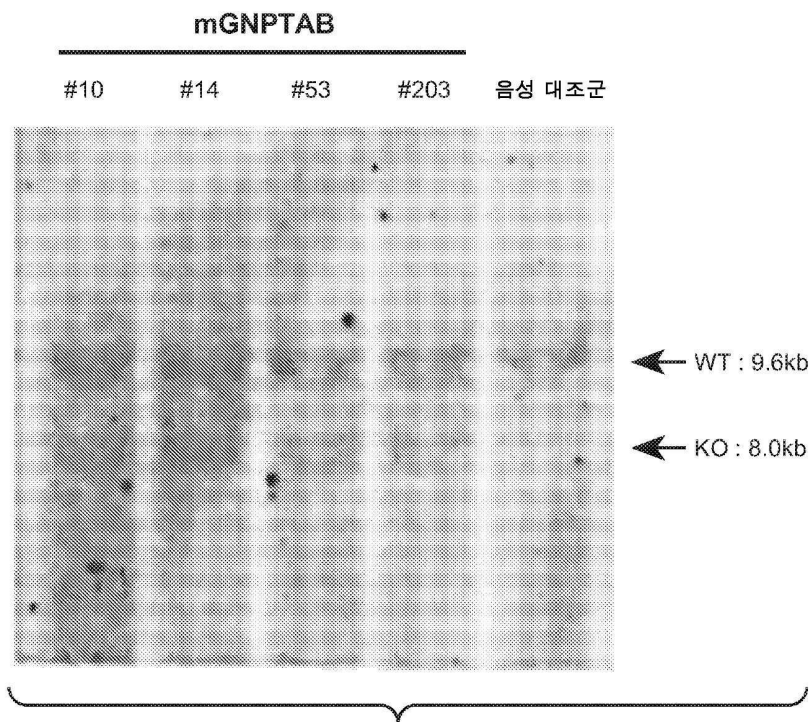
[0174]

도면

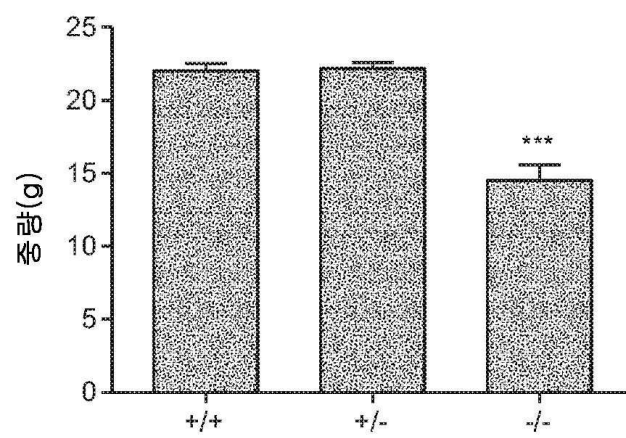
도면1a



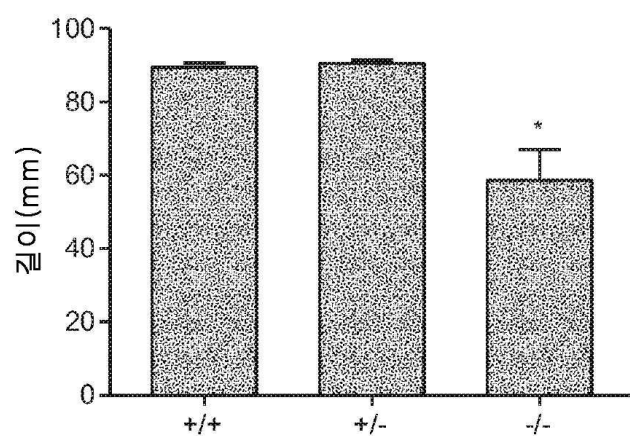
도면1b



도면2a

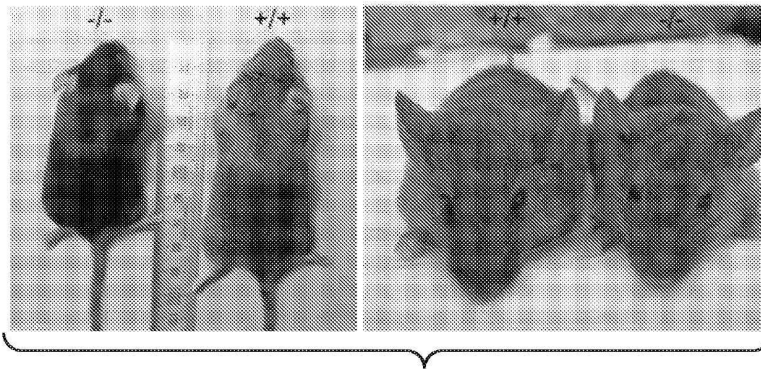


도면2b

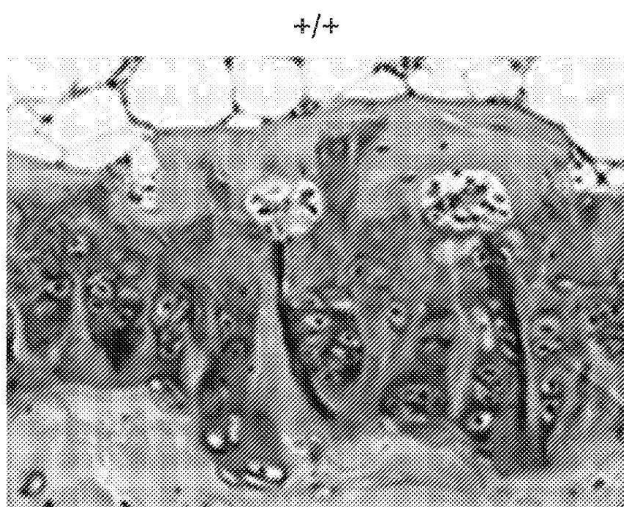




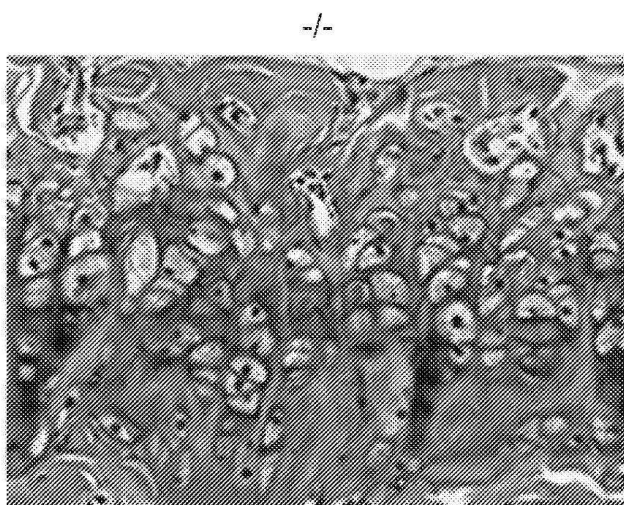
도면2c



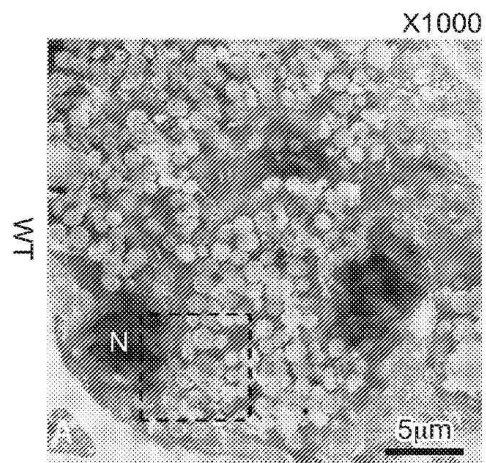
도면3a



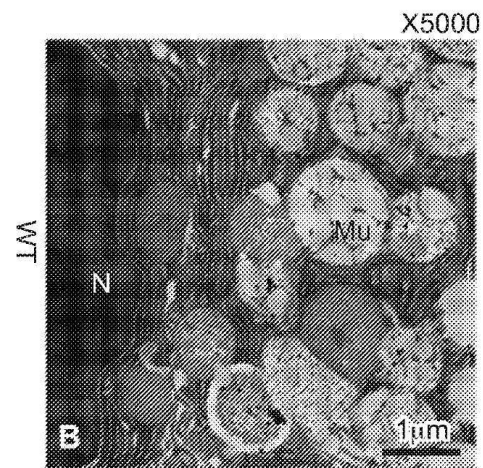
도면3b



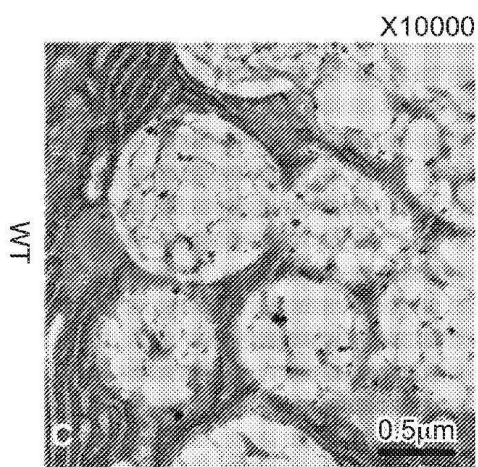
도면4a



도면4b

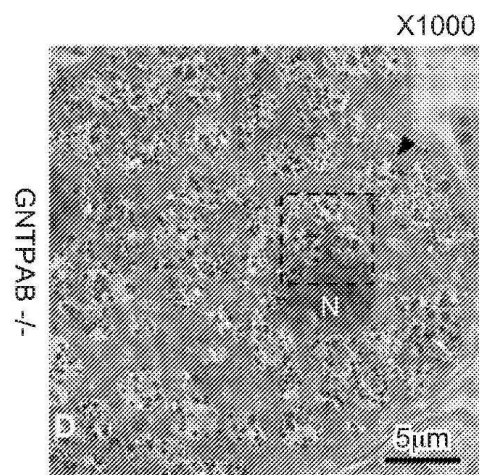


도면4c

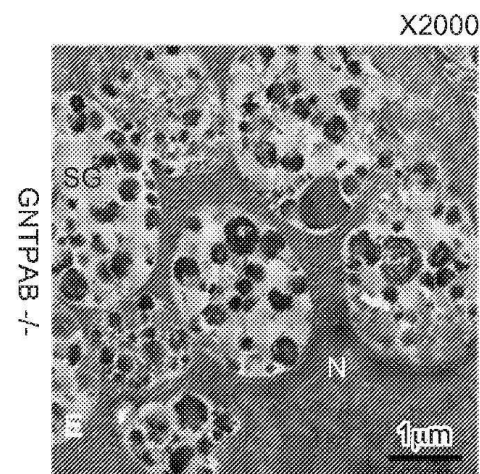




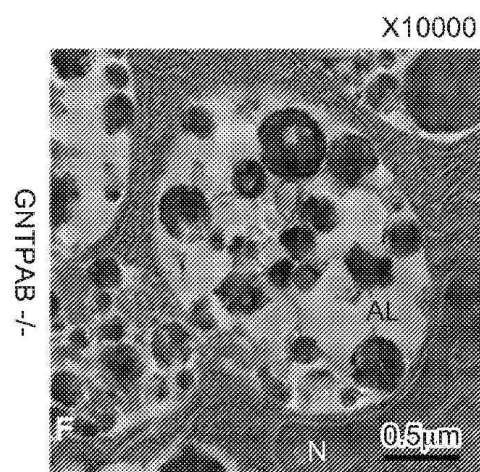
도면4d



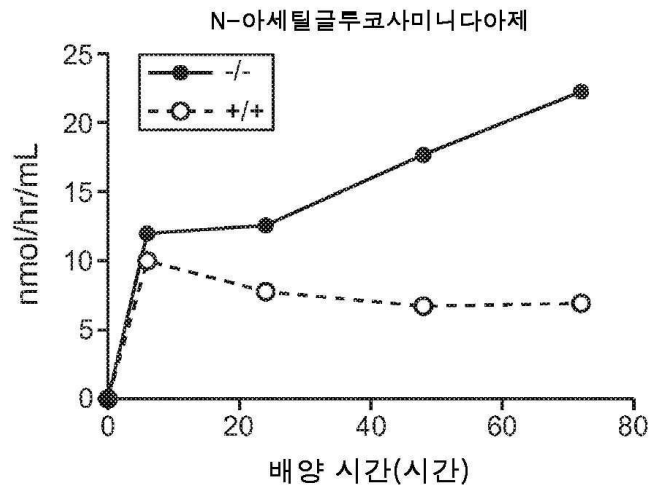
도면4e



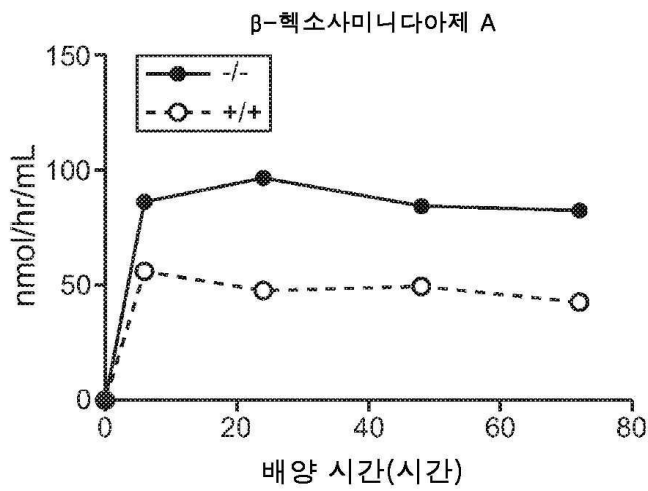
도면4f



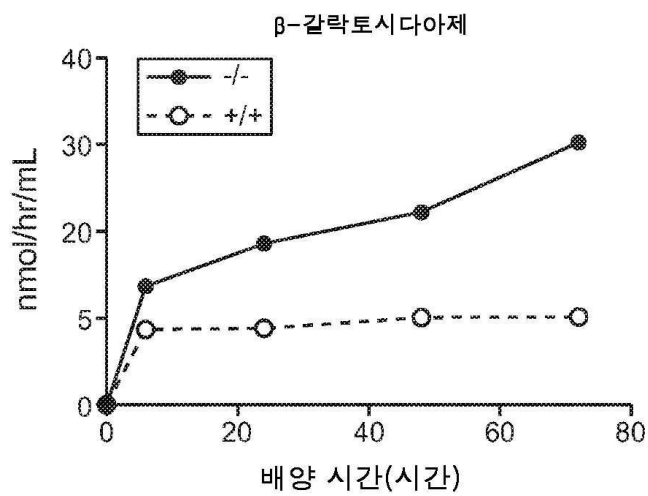
도면5a



도면5b

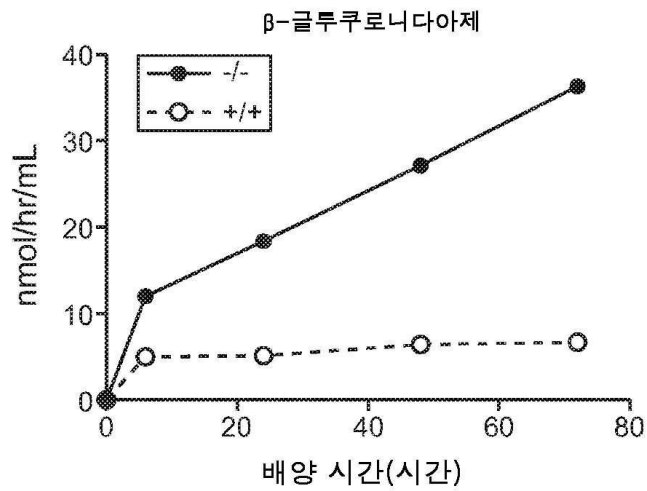


도면5c

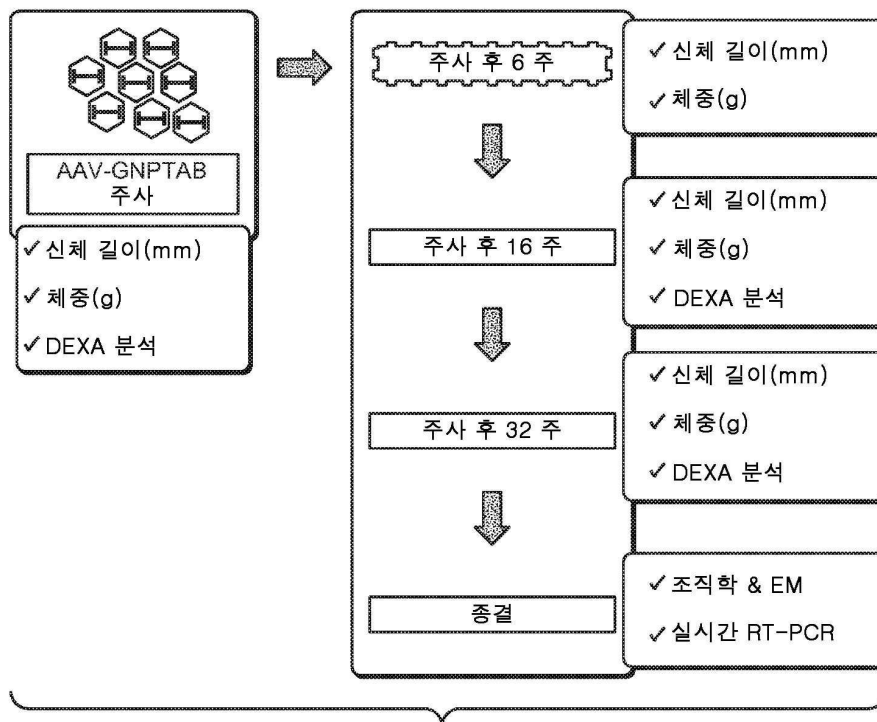




도면5d



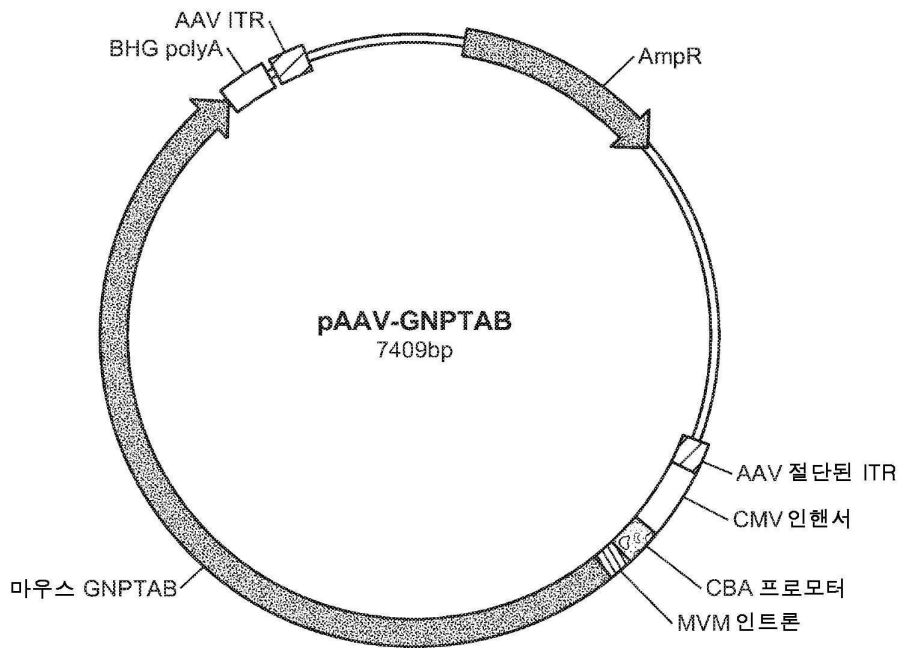
도면6a



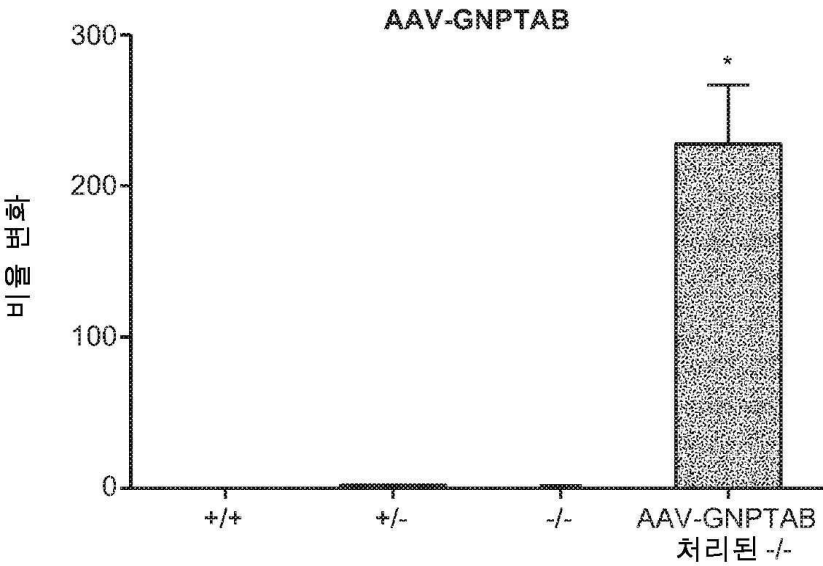
도면6b

동물	처리	희생 연령
야생형 (n=5)	PBS (플라세보)	모든 마우스에서 38 주령 (장기간 처리)
이형접합형 (n=5)	PBS (플라세보)	
KO 형 (n=5)	PBS (플라세보)	
KO 형 (n=4)	3E11drps AAV-GNPTAB	

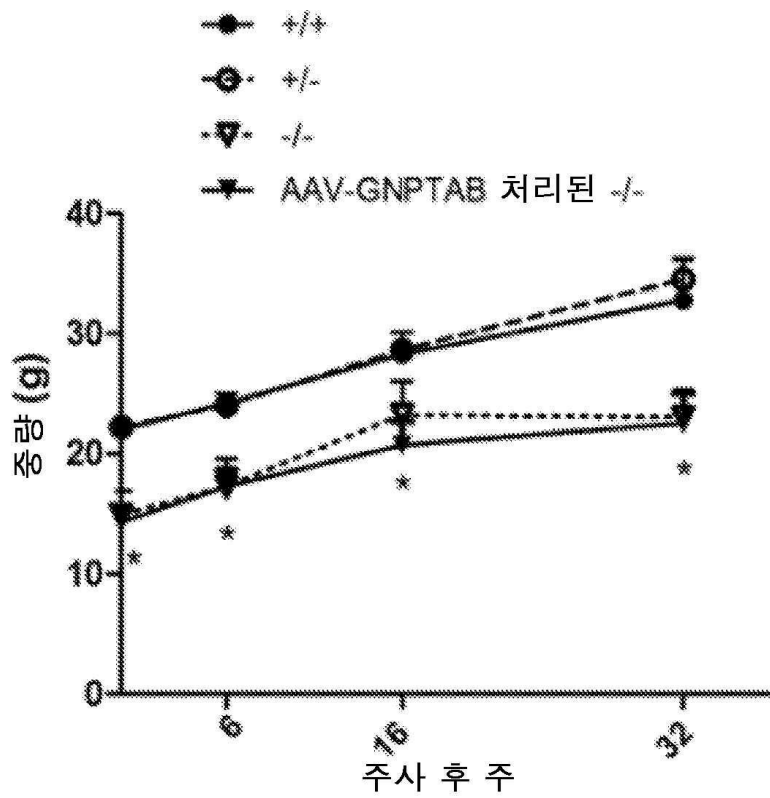
도면7a



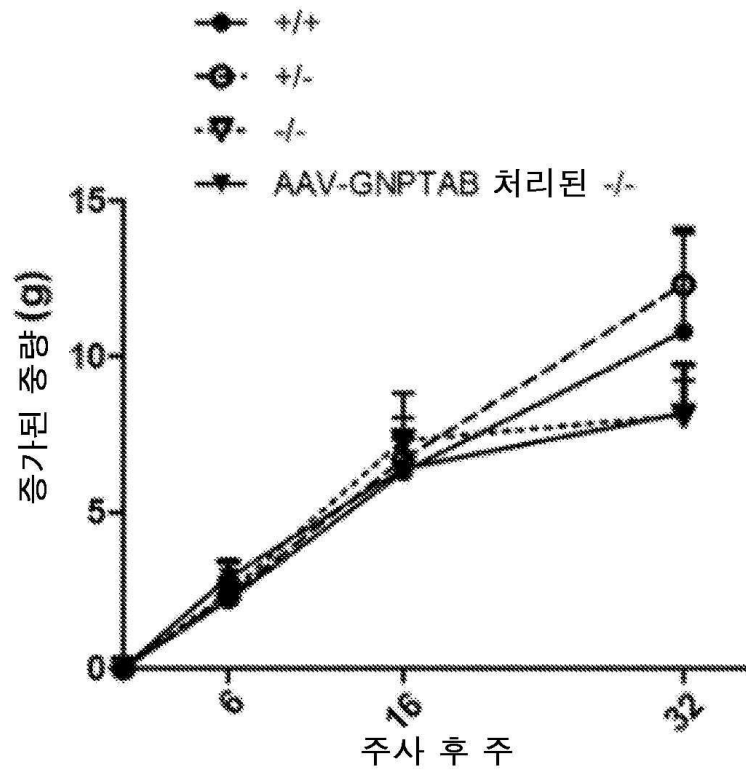
도면7b



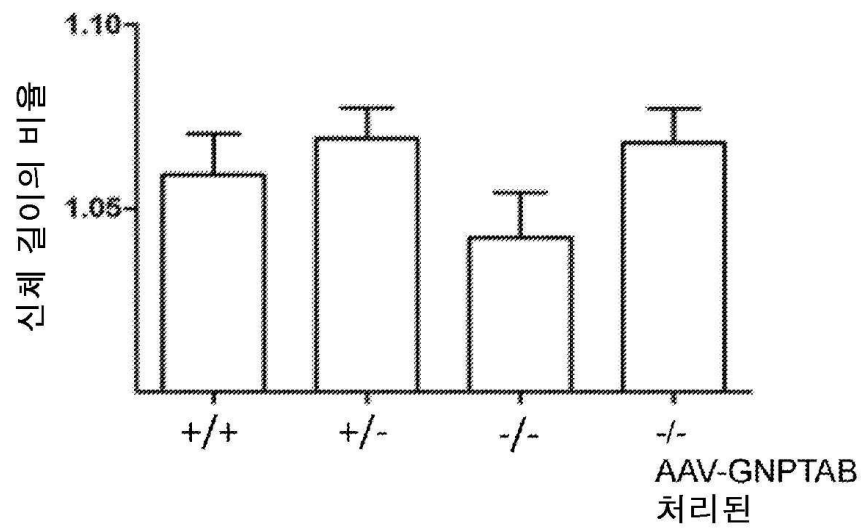
도면8a



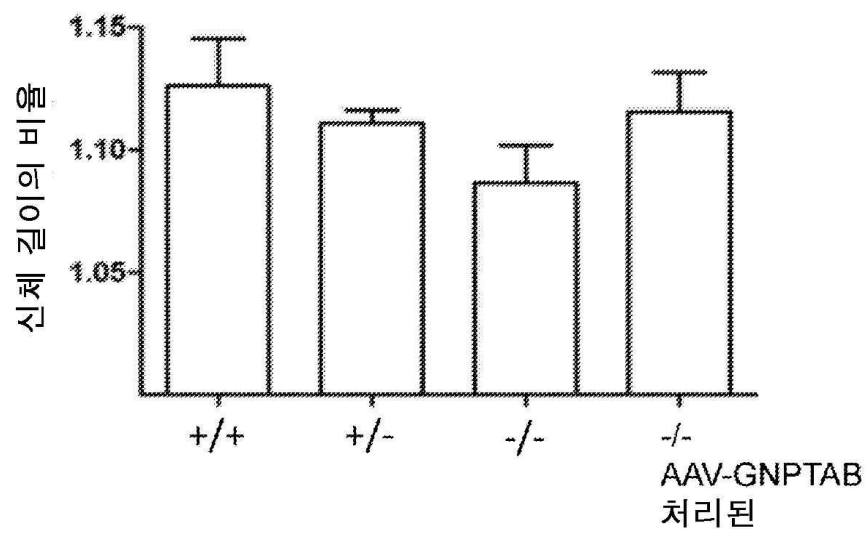
도면8b



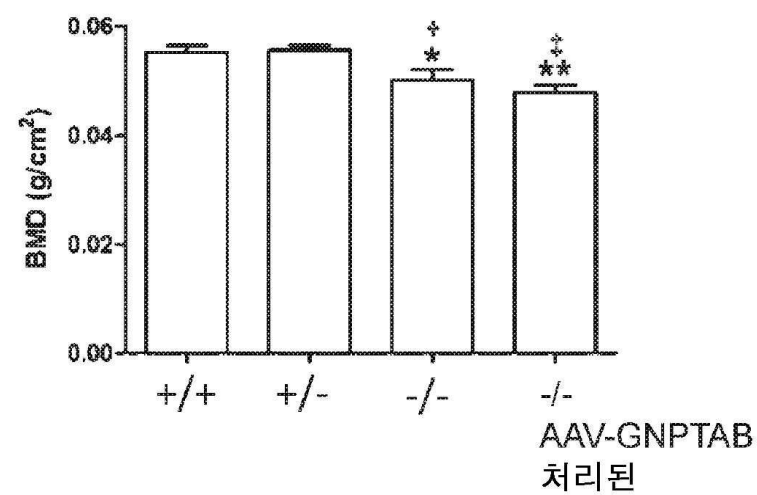
도면9a



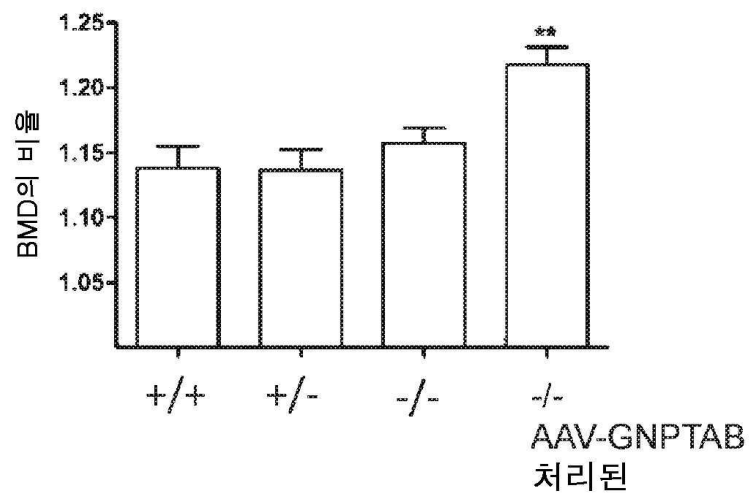
도면9b



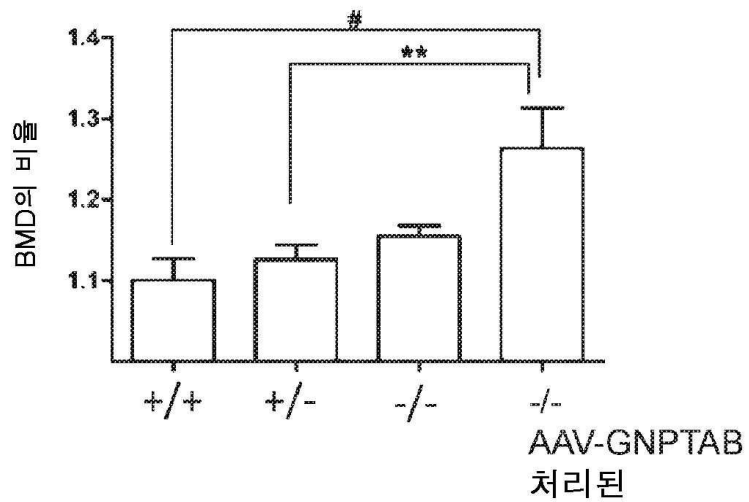
도면10a



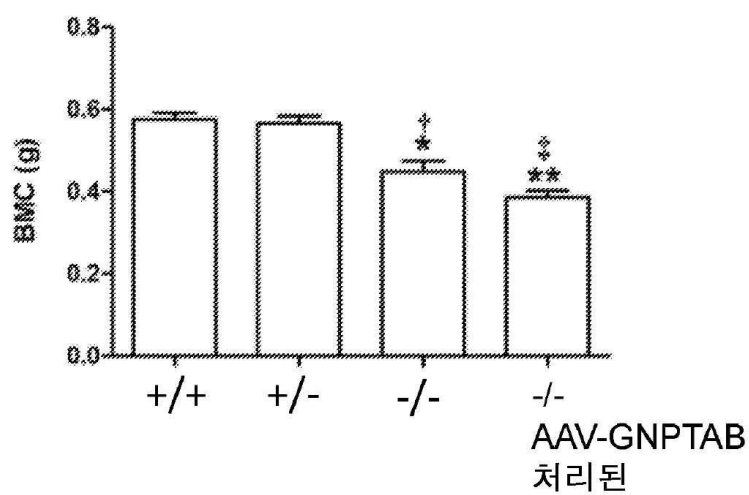
도면10b



도면10c

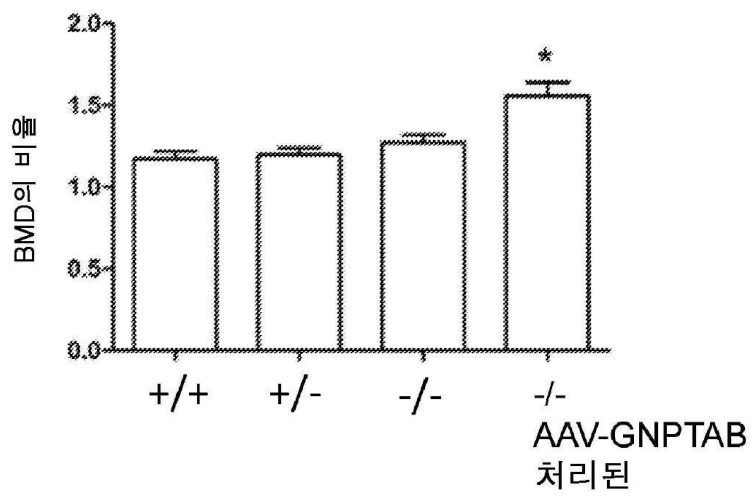


도면11a

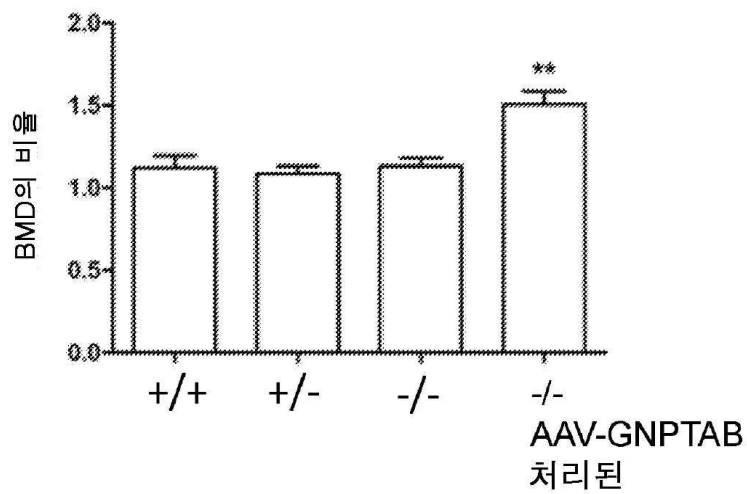




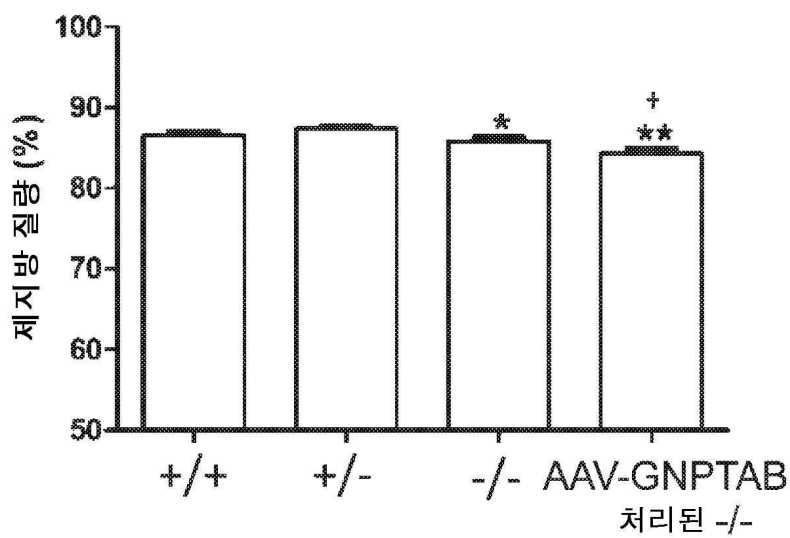
도면11b



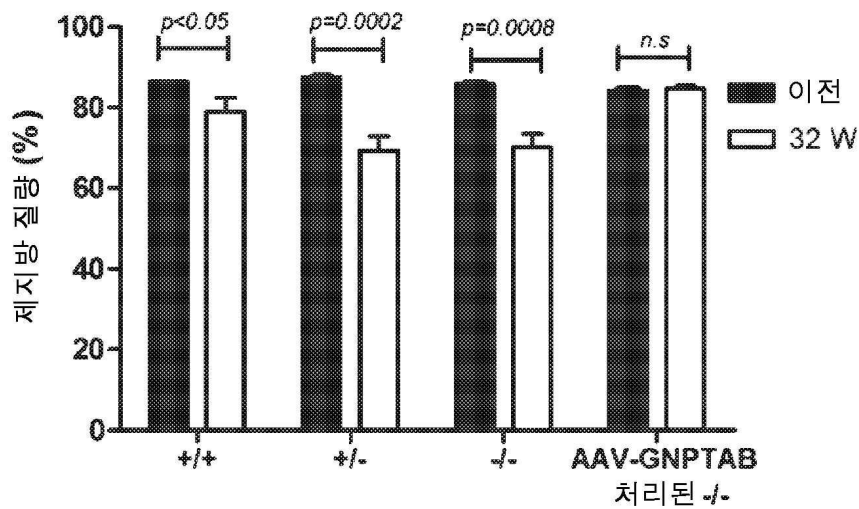
도면11c



도면12a



도면12b



## 서열목록

### SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

<120> ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTORS FOR  
TREATING MUCOLIPIDOSIS TYPE II

<130> 159792012640

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/267,502

<151> 2015-12-15

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1256

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Phe Lys Leu Leu Gln Arg Gln Thr Tyr Thr Cys Leu Ser His

1 5 10 15

Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Cys Phe Leu Gly Val Val Val Thr Ile Val

20 25 30

Ser Ala Phe Gln Phe Gly Glu Val Val Leu Glu Trp Ser Arg Asp Gln

35	40	45
Tyr His Val Leu Phe Asp Ser Tyr Arg Asp Asn Ile Ala Gly Lys Ser		
50	55	60
Phe Gln Asn Arg Leu Cys Leu Pro Met Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr		
65	70	75
		80
Trp Val Asn Gly Thr Asp Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Gln Val		
85	90	95
Arg Glu Gln Met Glu Glu Glu Gln Lys Ala Met Arg Glu Ile Leu Gly		
100	105	110
Lys Asn Thr Thr Glu Pro Thr Lys Lys Ser Glu Lys Gln Leu Glu Cys		
115	120	125
Leu Leu Thr His Cys Ile Lys Val Pro Met Leu Val Leu Asp Pro Ala		
130	135	140
Leu Pro Ala Asn Ile Thr Leu Lys Asp Leu Pro Ser Leu Tyr Pro Ser		
145	150	155
		160
Phe His Ser Ala Ser Asp Ile Phe Asn Val Ala Lys Pro Lys Asn Pro		
165	170	175
Ser Thr Asn Val Ser Val Val Val Phe Asp Ser Thr Lys Asp Val Glu		
180	185	190
Asp Ala His Ser Gly Leu Leu Lys Gly Asn Ser Arg Gln Thr Val Trp		
195	200	205
Arg Gly Tyr Leu Thr Thr Asp Lys Glu Val Pro Gly Leu Val Leu Met		
210	215	220
Gln Asp Leu Ala Phe Leu Ser Gly Phe Pro Pro Thr Phe Lys Glu Thr		
225	230	235
		240
Asn Gln Leu Lys Thr Lys Leu Pro Glu Asn Leu Ser Ser Lys Val Lys		
245	250	255
Leu Leu Gln Leu Tyr Ser Glu Ala Ser Val Ala Leu Leu Lys Leu Asn		
260	265	270
Asn Pro Lys Asp Phe Gln Glu Leu Asn Lys Gln Thr Lys Lys Asn Met		
275	280	285

Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Thr Ile Ser Pro Ala Tyr Leu Leu Trp  
290 295 300

Asp Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ser Lys Gln Asp Glu Asp Ile Ser Ala  
305 310 315 320

Ser Arg Phe Glu Asp Asn Glu Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Ile  
325 330 335

Glu Arg His Ala Pro Trp Val Arg Asn Ile Phe Ile Val Thr Asn Gly  
340 345 350

Gln Ile Pro Ser Trp Leu Asn Leu Asp Asn Pro Arg Val Thr Ile Val  
355 360 365

Thr His Gln Asp Val Phe Arg Asn Leu Ser His Leu Pro Thr Phe Ser  
370 375 380

Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln  
385 390 395 400

Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp  
405 410 415

Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr  
420 425 430

Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys  
435 440 445

Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp  
450 455 460

Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Ser Gly Gly Ser Arg Tyr Ile Ala Gly  
465 470 475 480

Gly Gly Gly Thr Gly Ser Ile Gly Val Gly Gln Pro Trp Gln Phe Gly  
485 490 495

Gly Gly Ile Asn Ser Val Ser Tyr Cys Asn Gln Gly Cys Ala Asn Ser  
500 505 510

Trp Leu Ala Asp Lys Phe Cys Asp Gln Ala Cys Asn Val Leu Ser Cys  
515 520 525

Gly Phe Asp Ala Gly Asp Cys Gly Gln Asp His Phe His Glu Leu Tyr

530                      535                      540  
 Lys Val Ile Leu Leu Pro Asn Gln Thr His Tyr Ile Ile Pro Lys Gly  
 545                      550                      555                      560  
 Glu Cys Leu Pro Tyr Phe Ser Phe Ala Glu Val Ala Lys Arg Gly Val  
                          565                      570                      575  
 Glu Gly Ala Tyr Ser Asp Asn Pro Ile Ile Arg His Ala Ser Ile Ala  
                          580                      585                      590  
  
 Asn Lys Trp Lys Thr Ile His Leu Ile Met His Ser Gly Met Asn Ala  
                          595                      600                      605  
 Thr Thr Ile His Phe Asn Leu Thr Phe Gln Asn Thr Asn Asp Glu Glu  
                          610                      615                      620  
 Phe Lys Met Gln Ile Thr Val Glu Val Asp Thr Arg Glu Gly Pro Lys  
 625                      630                      635                      640  
 Leu Asn Ser Thr Ala Gln Lys Gly Tyr Glu Asn Leu Val Ser Pro Ile  
                          645                      650                      655  
  
 Thr Leu Leu Pro Glu Ala Glu Ile Leu Phe Glu Asp Ile Pro Lys Glu  
                          660                      665                      670  
 Lys Arg Phe Pro Lys Phe Lys Arg His Asp Val Asn Ser Thr Arg Arg  
                          675                      680                      685  
 Ala Gln Glu Glu Val Lys Ile Pro Leu Val Asn Ile Ser Leu Leu Pro  
                          690                      695                      700  
 Lys Asp Ala Gln Leu Ser Leu Asn Thr Leu Asp Leu Gln Leu Glu His  
 705                      710                      715                      720  
  
 Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu  
                          725                      730                      735  
 Arg Ser Phe Leu Met Asn Ser Gln His Ala Lys Ile Lys Asn Gln Ala  
                          740                      745                      750  
 Ile Ile Thr Asp Glu Thr Asn Asp Ser Leu Val Ala Pro Gln Glu Lys  
                          755                      760                      765  
 Gln Val His Lys Ser Ile Leu Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser Glu Arg  
                          770                      775                      780



Leu Gln Arg Leu Thr Phe Pro Ala Val Ser Val Lys Val Asn Gly His  
 785                      790                      795                      800  
 Asp Gln Gly Gln Asn Pro Pro Leu Asp Leu Glu Thr Thr Ala Arg Phe  
                          805                      810                      815  
 Arg Val Glu Thr His Thr Gln Lys Thr Ile Gly Gly Asn Val Thr Lys  
                          820                      825                      830  
 Glu Lys Pro Pro Ser Leu Ile Val Pro Leu Glu Ser Gln Met Thr Lys  
                          835                      840                      845  
  
 Glu Lys Lys Ile Thr Gly Lys Glu Lys Glu Asn Ser Arg Met Glu Glu  
                          850                      855                      860  
 Asn Ala Glu Asn His Ile Gly Val Thr Glu Val Leu Leu Gly Arg Lys  
 865                      870                      875                      880  
 Leu Gln His Tyr Thr Asp Ser Tyr Leu Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys  
                          885                      890                      895  
 Lys Lys Tyr Phe Gln Asp Leu Leu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Lys Thr  
                          900                      905                      910  
  
 Gln Leu Ala Tyr Phe Thr Asp Ser Lys Asn Thr Gly Arg Gln Leu Lys  
                          915                      920                      925  
 Asp Thr Phe Ala Asp Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser  
                          930                      935                      940  
 Lys Phe Gly Phe Thr Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met  
 945                      950                      955                      960  
 Ile Asp Arg Ile Val Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu  
                          965                      970                      975  
  
 Phe Asp Lys Thr Ser Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln  
                          980                      985                      990  
 Phe Ala Phe Ser Tyr Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu  
                          995                      1000                      1005  
 Asn Ile Ser Gln Val Phe Asp Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val  
                          1010                      1015                      1020  
 Leu Ser Asp Arg Glu Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Glu Leu

1025                      1030                      1035                      1040

Pro Leu Ser Leu Gln Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn

1045                      1050                      1055

Cys Ser Lys Met Leu Pro Ala Asp Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro

1060                      1065                      1070

Pro Thr Gln Glu Ser Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys

1075                      1080                      1085

Ser Leu Val Thr Asn Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala

1090                      1095                      1100

Tyr Lys Asp Lys Asn Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu Glu

1105                      1110                      1115                      1120

Ile Ala Phe Lys Met Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln

1125                      1130                      1135

Leu Asp Asp Ile Arg Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp

1140                      1145                      1150

Asn Ile Asp His Asn His Lys Asp Ala Gln Thr Val Lys Ala Val Leu

1155                      1160                      1165

Arg Asp Phe Tyr Glu Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu

1170                      1175                      1180

Pro Arg Glu Tyr Arg Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu

1185                      1190                      1195                      1200

Trp Arg Ala Tyr Arg Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu

1205                      1210                      1215

Ala Thr Leu Ile Met Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Leu

1220                      1225                      1230

Ile Ala Leu Lys Arg Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu

1235                      1240                      1245

Ala Ser Pro Asn Arg Ile Arg Val

1250                      1255

<210> 2

<211> 1235

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Leu Leu Lys Leu Leu Gln Arg Gln Thr Tyr Thr Cys Leu Ser His

1 5 10 15

Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Cys Phe Val Gly Val Val Val Thr Ile Val

20 25 30

Ser Ala Phe Gln Phe Gly Glu Val Val Leu Glu Trp Ser Arg Asp Gln

35 40 45

Tyr His Val Leu Phe Asp Ser Tyr Arg Asp Asn Ile Ala Gly Lys Ser

50 55 60

Phe Gln Asn Arg Leu Cys Leu Pro Met Pro Ile Asp Val Val Tyr Thr

65 70 75 80

Trp Val Asn Gly Thr Asp Leu Glu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Gln Val

85 90 95

Arg Glu His Met Glu Glu Glu Gln Arg Ala Met Arg Glu Thr Leu Gly

100 105 110

Lys Asn Thr Thr Glu Pro Thr Lys Lys Ser Glu Lys Gln Leu Glu Cys

115 120 125

Leu Leu Thr His Cys Ile Lys Val Pro Met Leu Val Leu Asp Pro Pro

130 135 140

Leu Pro Ala Asn Cys Thr Leu Lys Asp Leu Pro Thr Leu Tyr Pro Ser

145 150 155 160

Phe His Ala Ala Ser Asp Met Phe Asn Val Ala Lys Pro Lys Asn Pro

165 170 175

Ser Thr Asn Val Ser Val Val Val Phe Asp Thr Thr Lys Asp Val Glu

180 185 190

Asp Ala His Ala Gly Pro Phe Lys Gly Gly Ser Lys Gln Met Val Trp

195 200 205

Arg Ala Tyr Leu Thr Thr Asp Lys Glu Ala Pro Gly Leu Val Leu Met

210 215 220

Gln Gly Leu Ala Phe Leu Ser Gly Phe Pro Pro Thr Phe Lys Glu Thr  
225 230 235 240  
Ser Gln Leu Lys Thr Lys Leu Pro Glu Lys Leu Ser Ser Lys Ile Lys  
245 250 255  
Leu Leu Arg Leu Tyr Ser Glu Ala Ser Val Ala Leu Leu Lys Leu Asn  
260 265 270  
Asn Pro Lys Gly Phe Gln Glu Leu Asn Lys Gln Thr Lys Lys Asn Met  
275 280 285

Thr Ile Asp Gly Lys Glu Leu Thr Ile Ser Pro Ala Tyr Leu Leu Trp  
290 295 300  
Asp Leu Ser Ala Ile Ser Gln Ser Lys Gln Asp Glu Asp Val Ser Ala  
305 310 315 320  
Ser Arg Phe Glu Asp Asn Glu Glu Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Ser Ile  
325 330 335  
Glu Arg His Ala Pro Trp Val Arg Asn Ile Phe Ile Val Thr Asn Gly  
340 345 350

Gln Ile Pro Ser Trp Leu Asn Leu Asp Asn Pro Arg Val Thr Ile Val  
355 360 365  
Thr His Gln Asp Ile Phe Gln Asn Leu Ser His Leu Pro Thr Phe Ser  
370 375 380  
Ser Pro Ala Ile Glu Ser His Ile His Arg Ile Glu Gly Leu Ser Gln  
385 390 395 400  
Lys Phe Ile Tyr Leu Asn Asp Asp Val Met Phe Gly Lys Asp Val Trp  
405 410 415

Pro Asp Asp Phe Tyr Ser His Ser Lys Gly Gln Lys Val Tyr Leu Thr  
420 425 430  
Trp Pro Val Pro Asn Cys Ala Glu Gly Cys Pro Gly Ser Trp Ile Lys  
435 440 445  
Asp Gly Tyr Cys Asp Lys Ala Cys Asn Asn Ser Ala Cys Asp Trp Asp  
450 455 460  
Gly Gly Asp Cys Ser Gly Asn Thr Ala Gly Asn Arg Phe Val Ala Gly

465					470					475					480				
Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Gln	His	Trp	Gln	Phe	Gly				
				485				490				495							
Gly	Gly	Ile	Asn	Thr	Ile	Ser	Tyr	Cys	Asn	Gln	Gly	Cys	Ala	Asn	Ser				
				500				505				510							
Trp	Leu	Ala	Asp	Lys	Phe	Cys	Asp	Gln	Ala	Cys	Asn	Val	Leu	Ser	Cys				
				515				520				525							
Gly	Phe	Asp	Ala	Gly	Asp	Cys	Gly	Gln	Asp	His	Phe	His	Glu	Leu	Tyr				
				530				535				540							
Lys	Val	Thr	Leu	Leu	Pro	Asn	Gln	Thr	His	Tyr	Val	Val	Pro	Lys	Gly				
				545				550				555				560			
Glu	Tyr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Ser	Phe	Ala	Asn	Ile	Ala	Arg	Arg	Gly	Val				
				565				570				575							
Glu	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asp	Asn	Pro	Ile	Ile	Arg	His	Ala	Ser	Ile	Ala				
				580				585				590							
Asn	Lys	Trp	Lys	Thr	Ile	His	Leu	Ile	Met	His	Ser	Gly	Met	Asn	Ala				
				595				600				605							
Thr	Thr	Ile	Tyr	Phe	Asn	Leu	Thr	Leu	Gln	Asn	Ala	Asn	Asp	Glu	Glu				
				610				615				620							
Phe	Lys	Ile	Gln	Ile	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Arg	Glu	Ala	Pro	Lys				
				625				630				635				640			
Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Gln	Lys	Ala	Tyr	Glu	Ser	Leu	Val	Ser	Pro	Val				
				645				650				655							
Thr	Pro	Leu	Pro	Gln	Ala	Asp	Val	Pro	Phe	Glu	Asp	Val	Pro	Lys	Glu				
				660				665				670							
Lys	Arg	Phe	Pro	Lys	Ile	Arg	Arg	His	Asp	Val	Asn	Ala	Thr	Gly	Arg				
				675				680				685							
Phe	Gln	Glu	Glu	Val	Lys	Ile	Pro	Arg	Val	Asn	Ile	Ser	Leu	Leu	Pro				
				690				695				700							
Lys	Glu	Ala	Gln	Val	Arg	Leu	Ser	Asn	Leu	Asp	Leu	Gln	Leu	Glu	Arg				
				705				710				715				720			



Gly Asp Ile Thr Leu Lys Gly Tyr Asn Leu Ser Lys Ser Ala Leu Leu  
725 730 735

Arg Ser Phe Leu Gly Asn Ser Leu Asp Thr Lys Ile Lys Pro Gln Ala  
740 745 750

Arg Thr Asp Glu Thr Lys Gly Asn Leu Glu Val Pro Gln Glu Asn Pro  
755 760 765

Ser His Arg Arg Pro His Gly Phe Ala Gly Glu His Arg Ser Glu Arg  
770 775 780

Trp Thr Ala Pro Ala Glu Thr Val Thr Val Lys Gly Arg Asp His Ala  
785 790 795 800

Leu Asn Pro Pro Pro Val Leu Glu Thr Asn Ala Arg Leu Ala Gln Pro  
805 810 815

Thr Leu Gly Val Thr Val Ser Lys Glu Asn Leu Ser Pro Leu Ile Val  
820 825 830

Pro Pro Glu Ser His Leu Pro Lys Glu Glu Glu Ser Asp Arg Ala Glu  
835 840 845

Gly Asn Ala Val Pro Val Lys Glu Leu Val Pro Gly Arg Arg Leu Gln  
850 855 860

Gln Asn Tyr Pro Gly Phe Leu Pro Trp Glu Lys Lys Lys Tyr Phe Gln  
865 870 875 880

Asp Leu Leu Asp Glu Glu Glu Ser Leu Lys Thr Gln Leu Ala Tyr Phe  
885 890 895

Thr Asp Ser Lys His Thr Gly Arg Gln Leu Lys Asp Thr Phe Ala Asp  
900 905 910

Ser Leu Arg Tyr Val Asn Lys Ile Leu Asn Ser Lys Phe Gly Phe Thr  
915 920 925

Ser Arg Lys Val Pro Ala His Met Pro His Met Ile Asp Arg Ile Val  
930 935 940

Met Gln Glu Leu Gln Asp Met Phe Pro Glu Glu Phe Asp Lys Thr Ser  
945 950 955 960

Phe His Lys Val Arg His Ser Glu Asp Met Gln Phe Ala Phe Ser Tyr

965	970	975	
Phe Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Val Gln Pro Leu Asn Ile Ser Gln Val			
980	985	990	
Phe His Glu Val Asp Thr Asp Gln Ser Gly Val Leu Ser Asp Arg Glu			
995	1000	1005	
Ile Arg Thr Leu Ala Thr Arg Ile His Asp Leu Pro Leu Ser Leu Gln			
1010	1015	1020	
Asp Leu Thr Gly Leu Glu His Met Leu Ile Asn Cys Ser Lys Met Leu			
1025	1030	1035	1040
Pro Ala Asn Ile Thr Gln Leu Asn Asn Ile Pro Pro Thr Gln Glu Ala			
1045	1050	1055	
Tyr Tyr Asp Pro Asn Leu Pro Pro Val Thr Lys Ser Leu Val Thr Asn			
1060	1065	1070	
Cys Lys Pro Val Thr Asp Lys Ile His Lys Ala Tyr Lys Asp Lys Asn			
1075	1080	1085	
Lys Tyr Arg Phe Glu Ile Met Gly Glu Glu Glu Ile Ala Phe Lys Met			
1090	1095	1100	
Ile Arg Thr Asn Val Ser His Val Val Gly Gln Leu Asp Asp Ile Arg			
1105	1110	1115	1120
Lys Asn Pro Arg Lys Phe Val Cys Leu Asn Asp Asn Ile Asp His Asn			
1125	1130	1135	
His Lys Asp Ala Arg Thr Val Lys Ala Val Leu Arg Asp Phe Tyr Glu			
1140	1145	1150	
Ser Met Phe Pro Ile Pro Ser Gln Phe Glu Leu Pro Arg Glu Tyr Arg			
1155	1160	1165	
Asn Arg Phe Leu His Met His Glu Leu Gln Glu Trp Arg Ala Tyr Arg			
1170	1175	1180	
Asp Lys Leu Lys Phe Trp Thr His Cys Val Leu Ala Thr Leu Ile Ile			
1185	1190	1195	1200
Phe Thr Ile Phe Ser Phe Phe Ala Glu Gln Ile Ile Ala Leu Lys Arg			
1205	1210	1215	

Lys Ile Phe Pro Arg Arg Arg Ile His Lys Glu Ala Ser Pro Asp Arg

1220

1225

1230

Ile Arg Val

1235