

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구

국제사무국

(43) 국제공개일

2023년 11월 16일 (16.11.2023)

WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2023/219394 A1

(51) 국제특허분류:

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/006293

(22) 국제출원일:

2023년 5월 9일 (09.05.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0057031 2022년 5월 10일 (10.05.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 공영윤 (KONG, Young-Yun); 06767 서울특별시 서초구 양재대로2길 90, 208동 1505호, Seoul (KR). 이준우 (RHEE, Joonwoo); 16867 경기도 용인시 수지구 용구대로2771번길 29, 113동 101호, Gyeonggi-do (KR). 강종설 (KANG, Jong-Seol); 05607 서울특별시 송파구 잠실로 88, 118동 2401호, Seoul (KR). 김지훈 (KIM, Ji-Hoon); 21986 인천광역시 연수구 송도문화로84번길 84, 101동 2501호, Incheon (KR).

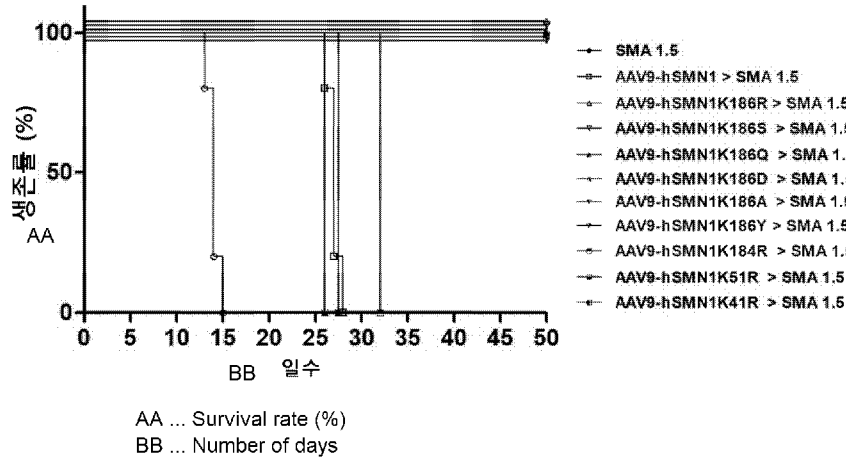
(74) 대리인: 류종우 등 (RYU, Jong Woo et al.); 06160 서울특별시 강남구 테헤란로69길 13, 명지빌딩 4층, 선정국제특허법률사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: HUMAN SMN1 PROTEIN VARIANT AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 인간 SMN1 단백질 변이체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention provides a mutated human SMN1 protein, a polynucleotide encoding same, and a pharmaceutical composition for treating spinal muscular atrophy, comprising a vector loading same. The composition lowers liver toxicity seen in existing SMN1 gene therapy through mutation of hSMN1, which can be used directly in humans, while increasing stability, making it possible to efficiently treat spinal muscular atrophy due to having a remarkable effect compared to the same dose and a long-lasting effect.

(57) 요약서: 본 발명은 변이된 인간 SMN1 단백질, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 이를 적재한 벡터를 포함하는 척수성 근위축증 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 인간에 직접적으로 활용 가능한 hSMN1의 변이를 통해 기존의 SMN1 유전자 치료제에서 나타나는 간 독성을 낮추면서도, 안정성을 높여 같은 용량 대비 효과가 현저하고 효과의 지속성이 좋아 효율적으로 척수성 근위축증을 치료할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 인간 SMN1 단백질 변이체 및 이의 용도 기술분야

- [1] 인간 SMN1 단백질 변이체, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 적재한 벡터 및 이를 포함하는 척수성 근위축증 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 척수성 근위축증(Spinal Muscular Atrophy; SMA)은 생존 운동 신경세포 1(Survival Motor Neuron 1, SMN1) 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기되는 보통 염색체 열성 신경근육 장애이다. 인코딩된 294개의 아미노산의 SMN 단백질에서 발생된 결핍은 광범위한 질병 특징 제시의 원인이 된다. 이들은 척수 내의 운동 신경세포의 변성으로부터 발생하는 진행성 근육 약화 및 위축증, 호흡 기능 부전 및 조기 사망을 포함한다. 질병 중증도는 약 10 내지 20% 기능성 SMN의 생성을 유도하는 패럴로그(paralogue) 유전자인 SMN2의 능력에 의해 상기 보조 유전자의 카피수와 역으로 상관된다.
- [3] 상기 질병의 근원적인 분자적 기초에 대한 현재의 이해를 기반으로 하여, 더 많은 질병에 걸리기 쉬운 세포에서 기능성 SMN의 수준을 증가시키는 것을 목적으로 하는 다수의 치료 전략이 고려되고 있다. 예를 들어, 노바티스의 졸겐스마(Zolgensma), 바이오젠의 스피라자(Spinraza) 등이 FDA 승인을 받은 SMA 치료제로 공지되어 있다. 특히, 졸겐스마의 경우, 개체에 투여할 경우 SMN1 유전자의 발현을 유도하여 SMA를 치료하거나, 증상 개선시킬 수 있다.
- [4] 그러나, 기존의 치료용 약학 조성물의 경우, 예를 들어, 스피라자와 같은 siRNA는 효과적인 치료를 위해 다회 투여가 요구될 뿐만 아니라, 1회의 투여 비용이 매우 높다. 뿐만 아니라, 졸겐스마와 같은 1회 투여로 SMA를 치료하는 치료제의 경우에도 1회 투여 비용이 매우 높을 뿐만 아니라, 일부 독성이 보고된 바 있다. 따라서, 유아기의 SMA 환자에게 폭넓게 사용하기 어렵고, 경제적인 부담이 높은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 따라서, 이와 같은 SMA 치료제의 개발에도 불구하고, 효과가 우수할 뿐만 아니라, 치료 비용이 낮고, 독성이 없는 치료제의 개발이 필요한 실정이다. 따라서, 본 발명자들은 이러한 문제점을 연구하기 위해 연구한 결과, 종래 졸겐스마보다 효과가 우수할 뿐만 아니라, 독성이 낮은 유전자 변이체를 개발하였다.

과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열에서 41번째, 51번째, 184번째 및/또는 186번째 위치의 라이신

(Lysine)이 다른 아미노산으로 치환된 인간 SMN1(Survival of motor neuron 1) 단백질 변이체를 제공한다.

- [7] 본 발명의 다른 측면은 상기 인간 SMN1 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [8] 본 발명의 다른 측면은 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 제공한다.
- [9] 본 발명의 다른 측면은 상기 벡터를 유효성분으로 포함하는 척수성 근위축증 (SMA) 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [10] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 척수성 근위축증 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 인간 SMN1 단백질 변이체, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 이를 적재한 벡터 및 이를 포함하는 척수성 근위축증 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 인간에 직접적으로 활용 가능한 hSMN1에 변이를 줌으로서, 기존의 SMN1 유전자 치료제에서 나타나는 간 독성을 낮추면서도, 안정성을 높여 같은 용량 대비 효과가 현저하고 효과의 지속성이 좋아 효율적으로 척수성 근위축증을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 AAV9-CMV-hSMN1, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 및 이의 변이체들을 주입하였을 경우 일자에 따른 쥐의 생존률을 나타낸 그래프이다.
- [13] 도 2는 AAV9-CMV-hSMN1, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 및 이의 변이체들을 주입하였을 경우 일자에 따른 쥐의 무게를 나타낸 그래프이다.
- [14] 도 3은 정위반사 테스트에서 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군이 몸을 뒤집는 정도를 나타낸 이미지이다.
- [15] 도 4는 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 정위반사 테스트에서의 뒤집기 시간을 나타낸 그래프이다.
- [16] 도 5는 negative geotaxis 테스트에서 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군이 몸을 돌리는 정도를 나타낸 이미지이다.
- [17] 도 6은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 negative geotaxis 테스트에서의 성공률을 나타낸 그래프이다.
- [18] 도 7은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 negative geotaxis 테스트에서의 몸을 돌린 시간(초)을 나타낸 그래프이다.
- [19] 도 8은 Tail suspension 테스트에서 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군이 다리를 차올리거나 다리를 꼬는 정도를 나타낸 이미지이다.
- [20] 도 9는 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 Tail suspension 테스트에서의 hindlimb clasping 현상 관찰 정도를 나타낸 그래프이다.

- [21] 도 10은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.
- [22] 도 11은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 생존률(%)을 나타낸 그래프이다.
- [23] 도 12는 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군으로부터 샘플링한 간 조직의 이미지이다.
- [24] 도 13은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 SMN 및 GAPDH 단백질의 발현 정도를 나타낸 웨스턴 블랏(14Dpi(Day post infection)) 이미지이다.
- [25] 도 14는 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 SMN 및 GAPDH 단백질의 발현 정도를 나타낸 웨스턴 블랏(28Dpi) 이미지이다.
- [26] 도 15는 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군 간에서 SMN, IGF1 및 IGFALS 유전자의 발현 정도를 분석한 qPCR을 수치화해 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 16은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 12일 차에 수득한 간 조직 Ki67 및 DAPI 면역 염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- [28] 도 17은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군의 25일 차에 수득한 간 조직 Ki67 및 DAPI 면역 염색 결과를 나타낸 이미지이다.
- [29] 도 18은 AAV9-CMV-hSMN1 주입군 및 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R} 주입군 간 조직에서 Ki67 양성 세포의 비율을 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

[30] 인간 SMN1 단백질 변이체

- [31] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열에서 41번째, 51번째, 184번째 및/또는 186 번째 위치의 라이신(Lysine)이 다른 아미노산으로 치환된 인간 SMN1(Survival of motor neuron 1) 단백질 변이체를 제공한다.
- [32] 본 명세서에서 사용한 용어 “인간 SMN1(Survival of motor neuron 1) 단백질”은 SMN 단백질을 암호화하는 유전자의 텔로머 사본이다. 중심체 사본은 SMN2이며, SMN1 및 SMN2는 염색체 5q13에서 500kbp 역복제의 일부이다. SMN1 및 SMN2는 동일한 단백질을 암호화한다. SMN1 및 SMN2의 구조적 차이는 엑손 스플라이스 인핸서인 엑손 7의 단일 뉴클레오티드 존재 여부이다. SMM1 돌연변이는 척수성 근위축증(SMA)와 관련성이 있으며, SMN2 단독 돌연변이는 질병으로 발현되지 않는다.
- [33] 상기 인간 SMN1 단백질은 야생형 폴리펩티드 형태를 의미할 수 있다. 상기 야생형 폴리펩티드는 자연에서 분리 가능하거나, 재조합 또는 합성에 의해 생산되는 것일 수 있다. 상기 야생형 폴리펩티드는 SMN1 단백질의 자연 발생적으로 절단되는 형태, 자연 발생적으로 분비되는 형태, 자연 발생적 변이 형태를 포함하

는 것일 수 있다. 상기 인간 SMN 1 단백질의 야생형 폴리펩티드는 서열번호 1 내지 6으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 야생형 폴리펩티드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

- [34] 상기 인간 SMN1 단백질은 인간 SMN1의 야생형 폴리펩티드 또는 이의 동형체(Isoform)일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 인간 SMN1 단백질의 동형체는 서열번호 6의 야생형 폴리펩티드와 약 90% 이상의 유사도를 갖는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 인간 SMN1 단백질의 동형체는 SMN1 isoform a, SMN1 isoform b, SMN1 isoform d, SMN1 isoform X1, SMN1 isoform X2 또는 이의 유사체일 수 있다.
- [35] 상기 SMN1 isoform a는 NCBI Reference Sequence는 NP_001284644.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 SMN1 isoform a는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [36] 상기 SMN1 isoform b는 NCBI Reference Sequence는 NP_075012의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 SMN1 isoform b는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [37] 상기 SMN1 isoform d는 NCBI Reference Sequence는 NP_000335.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 SMN1 isoform d는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [38] 상기 SMN1 isoform X1은 NCBI Reference Sequence는 XP_011541898.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 SMN1 isoform X1은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [39] 상기 SMN1 isoform X2는 NCBI Reference Sequence는 XP_016865275.1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 SMN1 isoform X2는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [40] 구체적으로, 상기 인간 SMN1 단백질의 동형체는 서열번호 1 내지 5로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 바람직하게는, 서열번호 1을 포함하는 SMN1 isoform d 또는 이의 변이체 일 수 있다.
- [41] 본 명세서에서 사용한 용어 “변이체(Variant)”는 야생형 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실, 추가, 치환된 형태를 의미한다. 구체적으로, 상기 변이체는 야생형 아미노산 서열의 N 말단 또는 C 말단에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 추가되거나 결실된 것일 수 있다. 또한, 상기 변이체는 야생형 아미노산 서열의 일부 아미노산이 치환된 것일 수 있다.
- [42] 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열과 비교하여 유비퀴틴화(Ubiquitination)가 저해된 것일 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 아미노산 서열과 비교하여 유비퀴틴화가 저해된 것일 수 있다.

- [43] 본 명세서에서 용어 “유비퀴틴화(Ubiquitination)”는 유비퀴틴 단백질이 기질 단백질에 부착되는 번역 후 변형의 일종이다. 유비퀴틴화는 일반적으로 유비퀴틴의 마지막 아미노산인 글리신이 기질 단백질의 라이신에 결합하여 프로테오솜에 의해 분해되는 것을 의미한다. 구체적으로, 유비퀴틴 글리신 잔기의 카리복실기와 기질 단백질의 엡실론(epsilon)-아미노기 사이에 이소펩티드 결합이 형성되는 것을 의미할 수 있다.
- [44] 일 구체예에 있어서, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열의 라이신(K)이 다른 아미노산으로 치환되는 것일 수 있다.
- [45] 상기 치환된 아미노산은 알라닌(A), 알지닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 라이신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프로린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 바람직하게는, 상기 치환된 아미노산은 비극성 아미노산일 수 있다.
- [46] 일 구체예에 있어서, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열의 라이신(K)이 알라닌(A)으로 치환되는 것일 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열의 C 말단에 존재하는 라이신이 다른 아미노산으로 치환된 형태일 수 있다.
- [47] 구체적으로, 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열의 186번째 라이신(K)이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상기 라이신(K)은 알라닌(A), 알지닌(R), 세린(S), 글루타민(Q), 아스파르트산(D) 또는 타이로신(Y)으로 치환될 수 있다. 이때, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 7 내지 12 및 36 내지 41으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [48] 또한, 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열의 41번째 라이신(K)이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상기 라이신(K)은 알라닌(A) 또는 알지닌(R)으로 치환될 수 있다. 이때, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 13 내지 18으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [49] 또한, 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열의 51번째 라이신(K)이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상기 라이신(K)은 알라닌(A) 또는 알지닌(R)으로 치환될 수 있다. 이때, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 19 내지 24로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [50] 또한, 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열의 184번째 라이신(K)이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있다. 이때, 상

기 라이신(K)은 알라닌(A) 또는 알지닌(R)으로 치환될 수 있다. 이때, 상기 인간 SMN1 변이체는 서열번호 25 내지 30 및 41으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[51] 상기 SMN1 단백질 변이체는, 라이신 잔기가 다른 아미노산으로 치환되어 유비퀴틴화가 상대적으로 저해됨으로써 변이체 단백질의 안정도가 증가하고 효과가 증가하며, 독성이 감소하는 것일 수 있다.

[52] 상기 인간 SMN1 변이체는 인간 SMN1 야생형 아미노산 서열의 라이신 잔기가 다른 아미노산으로 치환됨으로써, SMN1 단백질의 분해가 저해될 수 있다. 따라서, SMN1 단백질의 안정성이 향상되고, 독성이 감소할 수 있다.

[53] 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드

[54] 본 발명의 다른 측면은, 인간 SMN1 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 이때, 상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[55] 구체적으로, 상기 인간 SMN1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 35 및 42 내지 49로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[56] 이때, 상기 인간 SMN1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 35 및 42 내지 49로 구성된 군에서 선택된 하나의 폴리뉴클레오티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 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%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 것일 수 있다.

[57] 일 구체예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 폴리펩티드는 서열번호 7 내지 30 및 36 내지 41으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[58] 이때, 인간 SMN1 변이체의 폴리펩티드는 서열번호 7 내지 30 및 36 내지 41로 구성된 군으로부터 선택된 하나를 코딩하는 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 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%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 100%의 동일성을 가지는 것일 수 있다.

[59] 상기 폴리뉴클레오티드는 신호서열(Signal sequence) 또는 리더 서열(Leader sequence)을 코딩하는 핵산을 추가적으로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용한 용어 "신호서열"은 목적 단백질의 분비를 지시하는 신호펩타이드를 의미한다. 상기 신호펩타이드는 숙주 세포에서 번역된 후에 절단된다. 구체적으로, 상기 신호서열은 ER(Endoplasmic reticulum) 막을 관통하는 단백질의 이동을 개시하는 아미노산 서열이다.

- [60] 상기 신호서열은 당업계에 그 특징이 잘 알려져 있으며, 통상 16 내지 30개의 아미노산 잔기를 포함하나, 그보다 더 많거나 적은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 통상적인 신호 펩타이드는 기본 N-말단 영역, 중심의 소수성 영역, 및 보다 극성인(polar) C-말단 영역의 세 영역으로 구성된다. 중심 소수성 영역은 미성숙 폴리펩티드가 이동하는 동안 막지질 이중층을 통하여 신호서열을 고정시키는 4 내지 12개의 소수성 잔기를 포함한다.
- [61] 개시 이후에, 신호서열은 흔히 신호 펩티다아제(Signal peptidases)로 알려진 세포 효소에 의하여 ER의 루멘(Lumen) 내에서 절단된다. 이때, 상기 신호서열은 tPa(Tissue Plasminogen Activation), HSV gDs(Signal sequence of Herpes simplex virus glycoprotein D), 또는 성장 호르몬(Growth hormone)의 분비신호서열일 수 있다. 바람직하게, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵 세포에서 사용되는 분비 신호서열을 사용할 수 있다. 또한, 상기 신호서열은 야생형 신호서열을 사용하거나, 숙주세포에서 발현 빈도가 높은 코돈으로 치환하여 사용할 수 있다.
- [62] 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터
- [63] 본 발명의 다른 측면은, 상기 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터를 제공한다.
- [64] 상기 벡터는 숙주 세포에 도입되어 숙주 세포 유전체 내로 제조합 및 삽입될 수 있다. 또는 상기 벡터는 에피솜으로서 자발적으로 복제될 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 수단으로 이해된다.
- [65] 상기 벡터는 선형 핵산, 플라스미드, 파지미드, 코스미드, RNA 벡터, 바이러스 벡터 또는 이의 유사체일 수 있다. 구체적으로, 상기 벡터는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등)일 수 있다.
- [66] 또한, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스 벡터, 아데노-바이러스 연관 벡터(AAV), 렌티바이러스 벡터, 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(Baculovirus) 등) 또는 백시니아 벡터일 수 있다.
- [67] 일 구체예에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 아데노-바이러스 연관 벡터(AAV)일 수 있다. 상기 아데노-바이러스 연관 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11 또는 AAV12의 혈청형 캡시드를 포함할 수 있다.
- [68] 본 명세서에서 사용된 용어, 목적 단백질의 "유전자 발현" 또는 "발현"은, DNA 서열의 전사, mRNA 전사체의 번역 및 융합단백질 생산물 또는 이의 단편의 분비를 의미하는 것으로 이해된다. 유용한 발현 벡터는 RcCMV(Invitrogen, Carlsbad) 또는 이의 변이체일 수 있다.
- [69] 상기 발현 벡터는 포유류 세포에서 목적 유전자의 연속적인 전사를 촉진하기 위한 프로모터, 또는 전사 후 RNA의 안정상태 수준을 높이기 위한 우태 성장 인

자(Bovine growth hormone) 폴리아테닐레이션 신호서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 벡터는 인간 β -글루쿠로니다제 프로모터 또는 닭 β -액틴 프로모터 또는 CMV 프로모터를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 적재할 수 있다.

[70] 이때, SMN1 유전자 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것일 수 있다. 일 구체예에 있어서, 프로모터는 척수의 신경 세포에서 인간 SMN 1 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현시킬 수 있다. 다른 구체예에서, 프로모터는 척수의 운동 신경세포에서 SMN1를 발현시킬 수 있다.

[71] 일 구체예에 있어서, CMV 프로모터를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가적으로 적재할 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 CMV 프로모터는 서열번호 52의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[72] 일 구체예에 있어서, 상기 벡터는 pAAV9-CMV-hSMN1 K186R, pAAV9-CMV-hSMN1 K186S, pAAV9-CMV-hSMN1 K186Q, pAAV9-CMV-hSMN1 K186D, pAAV9-CMV-K186A, pAAV9-CMV-hSMN1 K186Y, pAAV9-CMV-hSMN1 K184R, pAAV9-CMV-K51R 또는 pAAV9-CMV-hSMN1 K41R의 구조를 가지는 것일 수 있다.

[73] 또한, 상기 벡터는 서열번호 33, 34 및 50 내지 57로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것일 수 있다.

[74] **SMN1 단백질 변이체의 용도**

[75] 본 발명의 다른 측면은, 상기 벡터를 유효성분으로 포함하는 척수성 근위축증(SMA) 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[76] 본 발명의 다른 측면은, 상기 벡터 또는 상기 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 척수성 근위축증을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[77] 본 명세서에서 용어, “척수성 근위축증(Spinal Muscular Atrophy; SMA)”은 퇴행성 신경질환의 일종으로, SMN(survival motor neuron) 단백질을 암호화하는 SMN1 유전자 돌연변이에 의해 발생하는 상염색체 열성의 유전적 질환이다. SMN 단백질의 감소는 척수와 뇌간 사이에 존재하는 운동신경세포의 기능손상을 야기시켜 근육의 동작을 명령하는 신호를 받지 못해 근력저하, 근위축 및 섬유축성 연축 등이 특징이다.

[78] 상기 척수성 근위축증은 SMA 1형, SMA 2형 또는 SMA 3형인 것일 수 있다. 상기 SMA 1형은 출생 후 6개월 미만에 발병하는 것이 특징으로, 도움 없이 앉는 것이 불가능하며, Werdnig-Hoffmann disease라고도 명명된다. 영아는 보통 2년 이내에 사망하는 것이 특징이다. 상기 SMA 2형은 출생 후 7 내지 18 개월에 발병하는 것이 특징으로, 도움 없이 앉거나 서있는 것은 가능하나 독립적 보행이 불가능하다. 보통 유아기까지 생존하는 것이 특징이다. 상기 SMA 3형은 출생 후 18개월 이상에서 발병하는 것이 특징으로, 독립적인 보행 가능하나, 유아기-점진적인 근육 약화가 발생한다.

- [79] 일부 구현예에서, 상기 개체는 영장류일 수 있으며, 구체적으로 소아 또는 성인 개체일 수 있다. 일 구현예에서, 상기 소아는 2개월령, 3개월령, 4개월령, 5개월령, 6개월령, 7개월령, 8개월령, 9개월령, 10개월령, 11개월령, 12개월령, 13개월령, 14개월령, 15개월령, 16개월령, 17개월령, 18개월령, 1세, 2세, 3세, 4세, 5세, 6세, 7세, 8세, 9세, 10세, 11세, 12세, 13세, 14세, 15세, 16세, 17세, 18세 중 어느 하나 미만이다. 일부 구현예에서, 인간 대상체는 18세 초과이다.
- [80] 상기 약학 조성물은 간 독성이 개선되어 출생 후 1개월 내지 18개월의 유아의 투여에도 적합하며, 1회의 투여에도 장기간 효과가 지속되는 것일 수 있다.
- [81] 상기 약학 조성물은 개체에 유효량 투여될 경우 척추동물 투여 부위의 운동 신경세포에 형질도입될 수 있다. 일 구현예에서, 운동 신경세포의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 100% 중 대략 어느 하나의 초과가 형질도입될 수 있다. 일 구현예에서, 척추 전체에 걸친(예를 들어, 허리, 가슴, 및 목 부위 전체에 걸친) 운동 신경세포의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 100%로 형질도입될 수 있다. 상기 약학 조성물 투여 후의 SMN1의 변이체가 발현되면, SMA 증상을 갖는 개체가 치료되거나 증상이 완화될 수 있다.
- [82] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 SMA 치료용 또는 예방용 약학 조성물에서 그 유효성분은 SMA 치료 활성을 나타내거나, 특히, SMA에 치료 효과를 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량% 내지 20.0 중량% 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 질환의 상태 개선 또는 치료(treatment) 효과, 특히 SMA의 상태 개선 또는 치료 효과를 유도할 수 있는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.
- [83] 본 명세서에서 사용된 용어, "치료"는 치료학적 처리 및 예방적 처리를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 이때, 예방은 개체의 병리학적 상태 또는 질환을 완화시키거나 감소시키는 의미로 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 용어 "치료"는 인간을 포함한 포유류에서 질환을 치료하기 위한 적용이나 어떠한 형태의 투약을 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 질환의 진행을 억제하거나 늦추는 것을 포함하며; 손상되거나, 결손된 기능을 회복시키거나, 수리하여, 질환을 부분적이거나 완전하게 완화시키거나; 또는 비효율적인 프로세스를 자극하거나; 심각한 질환을 완화하는 의미를 포함한다.
- [84] 상기 약학 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 멸균수, 에탄올, 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 등의 폴리올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

- [85] 상기 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본원 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.
- [86] 상기 약학 조성물이 적용(처방)될 수 있는 대상은 포유동물 및 인간이며, 특히 인간인 경우가 바람직하다. 본원의 약학 조성물은 유효성분 이외에, SMA 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [87] 이하, 본원 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본원 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본원 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.
- [88] 실시예 1. hSMN1 변이체를 포함하는 바이러스의 제조
- [89] 실시예 1.1. DNA 형질감염
- [90] 하기 표 1은 실험에 사용된 hSMN1 및 hSMN1 K186R의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. hSMN1 K186S, hSMN1 K186Q, hSMN1 K186D, hSMN1 K186A, hSMN1 K186Y, hSMN1 K184R, hSMN1 K51R 및 hSMN1 K41R은 각각 서열번호 1의 184번째, 186번째, 41번째 또는 51번째 아미노산 리신(K)을 각 아미노산으로 치환하여 제조하였다.
- [91] [표1]

	Amino acid sequence
hSMN1(서열번호 1)	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDT ALIKAYDKAVASFKHALKNG DICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKV GDKCSAIWSEDGCIYPATIAS IDFKRETCVVVYTYGYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQ NAQENENESQVSTDESENS RSPGNKSDNIKP <u>K</u> SAPWNSFLPPPPMPGPRLGPGKPGL KFNGPPPPPPPPHLLSC WLPPFPGSPPIPPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSG YHTGYMGMFRQNQKEGRC SHSLN
hSMN1 K186R(서열번호 7)	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDIWDDT ALIKAYDKAVASFKHALKNG DICETSGKPKTTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKV GDKCSAIWSEDGCIYPATIAS IDFKRETCVVVYTYGYGNREEQNLSDLLSPICEVANNIEQ NAQENENESQVSTDESENS

	RSPGNKSDNIKPR KFNGLPPPPPPPPHLLSC WLPPFPGSPPIIPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSG YHTGYMGRQNKKEGRC SHSLN
--	---

[92] 하기 표 2는 실험에 사용된 hSMN1의 핵산 서열을 나타낸 것이다.

[93] [표2]

	mRNA sequence
Human S MN1(서 열번호 35)	atggcgatgagcagcggcggcagtggtggcggcgtcccgagcaggaggattccgtgctgttccggc gcggcacaggccagagcgtatgattctgacatttgggatgatacagcactgataaaagcatatgataaag ctgtggcttcatttaagcatgctctaaagaatggtgacatttgtgaaacttcgggtaaaccacacacacac ctaaaagaaaacctgctaagaagaataaaagccaaaagaagaatactgcagcttccttacaacagtggga aagtggggacaaatgttctgccatttggtcagaagacggttgcatftaccagctaccattgcttcaattg attttaagagagaaacctgtgtgtgtgttacactggatattgaaatagagaggagcaaaatctgtccgat ctactttcccaatctgtgaagtagctaataatagaacaaaatgctcaagagaatgaaaatgaaagcca agtttcaacagatgaaagtgaagaactccaggtctcctggaaataaatcagataacatcaagcccaatct gtccatggaactcttttctccctccaccaccccccatgccaggcccaagactgggaccaggaaagcca ggtctaaaattcaatggcccaccaccgccaccgccaccaccaccaccacttactatcatgtgtggtgc ctccatttcttctggaccaccaataattccccaccacctcccatatgtccagattctcttgatgatgctgat gctttgggaagtatttaattcatggtacatgagtggtatcatactggctattatagggttcagacaaaa tcaaaaagaagggaaggtgctcacattcctaaattaa

[94] CMV 프로모터를 가지는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터에 탑재된 돌연변이 인간 SMN1 유전자를 제조하기 위하여, HEK-293T cell에 2 μ g의 DNA(pAAV9-CMV-hSMN1(서열번호 33), pAAV9-CMV-hSMN1 K186R(서열번호 34), pAAV9-CMV-hSMN1 K186S(서열번호 50), pAAV9-CMV-hSMN1 K186Q(서열번호 51), pAAV9-CMV-hSMN1 K186D(서열번호 52), pAAV9-CMV-K186A(서열번호 53), pAAV9-CMV-hSMN1 K186Y(서열번호 54), pAAV9-CMV-hSMN1 K184R(서열번호 55), pAAV9-CMV-K51R(서열번호 56) 또는 pAAV9-CMV-hSMN1 K41R(서열번호 57)를 각각 8 μ g의 Rep2/Cap9 플라스미드 (Cell biolabs, VPK-418 플라스미드), (addgene, 112865_Rep2/Cap9) 및 4 μ g의 p헬퍼(pHelper) 바이러스 플라스미드 (addgene, 112867_pAdDeltaF6) 와 함께 삼중 형질감염(triple transfection)시켰다. 이때, 1 μ l/ μ g의 polyethylenimine(PEI)와 Opti-MEM™을 사용하였다. 형질감염에는 100 mm 디쉬 42장을 각각 사용하였다. 형질감염 후 20시간 후에 새 배지로 교체하였으며, 48시간 동안 더 배양하였다.

[95] 실시예 1.2. AAV 생산 및 정제

[96] 형질감염 48시간 후 각 디쉬의 세포를 스크래퍼로 긁어 50 ml 튜브에 수집한 뒤, 420xg, 10분, 4°C 조건에서 원심분리하였다. 상등액은 버리고, 펠렛을 용해

버퍼(5 M NaCl, 1 M Tris HCl, ultrapure water)에 재현탁하고, 동결-해동 과정을 3회 진행하였다. 상기 과정에서 액체질소 및 waterbath를 이용하여 얼리고 녹이는 과정을 반복하여 수행하였다. 상기 과정을 3회 수행한 후, 1,167xg, 15분, 4°C 조건에서 원심분리하였다. 그 후, 상등액을 다른 50 ml 튜브로 옮겨서 벤조나아제(benzonase)를 50 U/ml로 처리한 뒤, 37°C에서 10분에 한 번씩 휘저어주며 총 30분 동안 유지하였다.

[97] 그 후, 13,490xg, 20분, 4°C조건에서 원심분리하였으며, 상등액을 0.45 μ m pore 필터로 여과하여 AAV가 포함되어 있는 순수한 분획물인 조 용해물(crude lysate)를 수득하였다. 상기 분획물을 4°C에 보관해놓은 상태에서, 15%, 25%, 40%, 60%의 요오딕사놀 구배(iodixanol gradient)를 형성하기 위해, 초원심분리관에 하기 표 3과 같은 구성으로 요오딕사놀을 넣어 주었다. 하기 표 3은 조성물의 성분을 나타낸 것이다.

[98] [표3]

조성물 이름	성분
15% Iodixanol	12.5 ml of Optiprep density gradient medium
	10 ml of 5 M NaCl
	10 ml of 5x PBS-MK
	17.5 ml of Ultrapure water
25% Iodixanol	20.8 ml of Optiprep density gradient medium
	10 ml of 5x PBS-MK
	19.2 ml of Ultrapure water
	100 μ L of phenol red
40% Iodixanol	33.3 ml of Optiprep density gradient medium
	10 ml of 5x PBS-MK
	6.7 ml of Ultrapure water
60% Iodixanol	50 ml of Optiprep density gradient medium
	100 μ L of phenol red

[99] 그 후, 초원심분리관에 15% 요오딕사놀 8 ml을 가장 먼저 넣고, 25% 5.5 ml, 40% 5 ml, 60% 4.5 ml와 같은 순서로 튜브의 밑바닥에 넣음으로써 아래쪽에 더 높은 농도의 요오딕사놀 분획이 위치하도록 하였다. 이 요오딕사놀 구배의 가장 위에 4°C에서 보관하였던 조 용해물을 넣고 301,580xg, 2시간, 12°C 조건에서 초원심분리하였다. 그 후, AAV가 포함되어 있는 40% 요오딕사놀에 바늘을 꽂고 뽑아내어 새로운 튜브에 옮긴 뒤 4°C에 보관하였다.

[100] 실시예 1.3. AAV의 탈염 및 농축

[101] 원심분리 필터 튜브에 1xPBS-MK 5 ml을 넣고 4,000xg, 5분, 4°C 조건에서 원심 분리하여 프리-린스(pre-rinse)과정을 진행하였고, 그 사이에 4°C에 보관해놓은 AAV 분획에 1xPBS-MK 5 ml을 넣었다. 웨이스트 튜브(Waste tube)를 비우고 다시 필터를 연결한 뒤 1xPBS-MK를 혼합한 AAV 분획물을 넣은 다음, 4,000xg, 1시간, 4°C 조건에서 원심분리하였다.

[102] 필터 위에 1 ml 정도의 분획물이 남을 때까지 추가적으로 원심분리를 한 뒤, 웨이스트 튜브를 비운 뒤에 필터 위에 1xPBS-MK 13 ml을 넣고 다시 4,000xg, 1시간, 4°C 조건에서 원심분리하여 탈염화를 진행하였다. 탈염화는 3회 이상 반복하였다. 탈염화가 완료된 상황에서 마지막으로 1xPBS-MK 13 ml에 계면활성제를 0.01%로 혼합해 투여하고, 4,000xg, 1시간, 4°C 조건에서 최종 볼륨이 200 μ l이 될 때까지 원심분리하였다. 그 후, 필터위에 남은 AAV 분획물을 새로운 튜브로 옮긴 뒤, 4°C 조건에서 보관하여 SMN1 유전자를 탑재한 AAV 벡터를 수득하였다.

[103] 실시예 1.4. AAV의 역가 확인

[104] SMN1 유전자의 발현 정도를 분석하기 위하여, quantitative PCR(qPCR)을 수행하였다. 구체적으로, 1 uM forward primer, 1 uM reverse primer, 연속 희석한 template DNA, SYBR Green qPCR mix를 이용하여 quantitative PCR(qPCR)을 수행하였다. 하기 표 4는 qPCR에 사용된 프라이머의 서열을 나타낸 것이다.

[105] [표4]

방향	프라이머 서열	서열번호
Forward primer	5'-CCCACTTGGCAGTAC ATCAA-3'	31
Reverse primer	5'-GCCAAGTAGGAAAG TCCCAT-3'	32

[106] 표준 곡선을 만들기 위해 전이유전자 발현 플라스미드(transgene expressing plasmid)에 제한효소(restriction enzyme)를 처리하여 선형화하였다. 다음으로, 이를 2%의 아가로스 겔에 전기영동하여 정제하였다. 이 DNA는 1×10^9 vector genomes(VG)/ μ l로 희석되었으며, 표준 곡선을 위해서 최종적으로 1×10^7 부터 1×10^1 까지 1/10 배씩 희석하였다. AAV에 존재하는 유전자의 경우, 먼저 2 μ l의 AAV vector stock에 DNase1 buffer 198 μ l, DNase1 2 μ l(1 U/ μ l)를 섞어 1×10^{-2} 의 농도를 만든 뒤, 37°C에서 30분간 유지하였다. DNase1을 고온에서 비활성화한 뒤, 프로테아아제 K 2 μ l(10 mg/ml)를 넣고 50°C에서 1시간 동안 유지한 뒤 다시 고온에서 비활성화시켰다. 다음으로, AAV 게놈용 샘플을 위해 최종 1×10^{-3} 부터 1×10^{-5} 까지 1/10 배씩 희석하였다. 표준곡선용, AAV 게놈용 샘플에 qPCR mix를 넣고 하기 표 5과 같은 조건에서 qPCR을 수행하였다.

[107] [표5]

단계	조건
----	----

Step1	95°C, 5 min, 1 cycle
Step2	95°C, 10 min, 1cycle
Step3	95°C, 10 s / 60°C 40 s / 72°C, 1 s, 40 cycles
Step4	40°C, 10 s, 1 cycle

- [108] qPCR 후 AAV 벡터의 농도를 표준 곡선의 Ct값 기준으로 환산하였고, 최종적으로 3×10^{13} VG/ml의 AAV를 수득하였다.
- [109] 실시예 2. AAV의 주입
- [110] 상기 실시예 1에서 수득한 SMN1을 포함하는 AAV 또는 돌연변이 SMN1을 포함하는 AAV를 새로 태어난 타입 1.5 SMA 쥐에 주입하였다.
- [111] SMA 모델쥐는 Jackson lab에서 SMA type 1 (Smn^{-/-}; SMN2^{+/+}), SMA type 2 (Smn^{-/-}; SMN Δ 7^{+/+}; SMN2^{+/+})mouse를 각각 구매하였으며, 이 둘을 교배하여 SMA type 1.5 (Smn^{-/-}; SMN Δ 7^{+/-}; SMN2^{+/+})mouse를 제작하여 실험에 사용하였다.
- [112] 주입 과정은 다음과 같다. 태어난 새끼의 발가락 일부를 잘라 50mM NaOH가 담겨 있는 튜브에 넣고 95°C에 30분 정도 둔다. 조직이 녹은 것을 확인한 뒤 마우스 SMN 결실을 확인할 수 있는 프라이머로 PCR을 수행하였다. 그 결과 돌연변이(Mutant)로 확인된 개체에 대하여 AAV 주입을 수행하였다. AAV 주입은 태어난 지 24시간 이내에 수행하였으며, 1 ml, 31G, 8 mm 인슐린 주사기를 이용하여 얼음 마취 후 얼굴 정색으로 혈관내 정맥 투여하였다.
- [113] 실험군으로 AAV9-SMN, AAV9-SMN^{K186R}, AAV9-SMN^{K186S}, AAV9-SMN^{K186Q}, AAV9-SMN^{K186D}, AAV9-SMN^{K186A}, AAV9-SMN^{K186Y}, AAV9-SMN^{K41R}, AAV9-SMN^{K51R}, AAV9-SMN^{K184R}을 1.2×10^{11} VG/g(체중)의 양으로 주입하였다. 주입 후에는 37°C에서 30분 이상 유지하고 개체가 정상적으로 마취에서 회복되는 것을 확인한 뒤 어미가 있는 케이지로 옮겼다.
- [114] 그 후, AAV가 주입된 쥐는 태어난 케이지에 있던 어미의 보살핌을 받는 상태로 유지되었고, 매일 생존 여부 및 무게를 기록하였다.
- [115] 그 결과, 도 1에 나타낸 것과 같이, 186번째 아미노산의 변이체를 주입한 실험군(K186R, K186S, K186Q, K186D, K186A, K186Y, 세모 형태 표시)은 야생형 대조군(둥그라미 형태 표시)와 같이 생존 기간이 증가하여 50일 이상 생존하였다. 그러나, 184번째, 41번째 및 51번째 아미노산의 변이체를 주입한 타 변이군(K41R, K51R, K184R, 네모 형태 표시)은 상대적으로 이른 4주차에 사망하였다.
- [116] 이러한 결과는, 41번째, 51번째, 184번째 리신은 치환되더라도 SMN의 기능적 차이가 유발되지 않으나, 186번째 리신은 다양한 아미노산으로 치환되었을 경우에 효과가 증가함을 의미한다.
- [117] 또한, 도 2에 나타낸 것과 같이, K186R, K186S, K186Q, K186D, K186A, K186Y, K41R, K51R, K184R 군 모두 대조군에 비해 무게가 무거운 것을 확인하였다. 특

히, 타 변이 군(K186S, K186Q, K186D, K186A, K186Y)을 주입하였을 경우에 쥐의 무게가 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[118] 실험예 1. 동물 모델의 정위반사 테스트

[119] 운동 기능 테스트로 정위반사(Righting reflex), Negative geotaxis 및 Tail suspension(Hindlimb clasp)의 3가지를 수행하였다. 정위반사는 생후(Postnatal day, PND) 5일경부터, Negative geotaxis 및 Tail suspension(Hindlimb clasp)은 생후 20일경부터 수행하였다.

[120] 정위반사는 쥐를 뒤집었을 때 등쪽 근육을 이용하여 몸을 뒤집어 바로 설 수 있는지를 확인하는 실험으로, 갓 태어난 어린 쥐의 경우는 몸을 뒤집지 못하며, SMA 모델 쥐의 경우에도 몸을 뒤집지 못하는 것으로 보고되어 있다. 오른쪽 등이 땅에 완전히 닿게 하는 경우와 왼쪽 등이 땅에 완전히 닿게 하는 경우를 기준으로 판단하였다. 각 30초씩 관찰하여 뒤집어 섰을 경우 걸린 시간을 기록하였고, 뒤집어 서지 못한 경우는 30초로 기록하였다. 각 3회씩 측정한 평균 시간을 계산하여 기능을 평가하였다. 약 2주 이상의 시간이 흐르고 모든 쥐들이 빠르게 몸을 뒤집어 일어나는 시기부터는 정위반사 측정을 중단하였다.

[121] 그 결과, 도 3에 나타낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우 올 빠르게 몸을 뒤집는 것을 확인하였다. 더불어, 도 4에 나타낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 SMA 모델 쥐의 경우, 생후 약 11일부터 뒤집기 시작하였으며, 점점 뒤집는 속도가 빨라졌으나 PND14가 되었을 때에도 뒤집는 데에 10초 정도가 소요되었다. 그러나, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우, 생후 9일부터 약 25초만에 뒤집기 시작함을 확인할 수 있었으며, 약 13일 정도가 되었을 때에는 1 내지 2초만에 몸을 뒤집을 수 있음을 확인하였다.

[122] 실험예 2. Negative geotaxis 테스트

[123] Negative geotaxis는 기울어진 경사면에서 본능적으로 쥐가 몸을 위쪽으로 틀어서 위로 올라가려고 하는 것을 측정하는 실험으로, 몸에 전체적인 균형이 잡혀 있고 그에 맞춰 근육을 사용하는 경우에 이러한 행동이 가능한 것으로 알려져 있다. 쥐를 약 50도 경사에서 머리가 아래쪽을 향하도록 했을 경우 몸을 얼마나 빨리 반대방향으로 돌리는 지를 각 실험군별로 매일 측정하였다. 몸을 돌리는 정도는 처음 아래쪽을 향하고 있던 것의 180도 반대로 완전히 트는 경우만 유효한 것으로 판단하였다. 10회 반복하여 테스트하였으며, 몸을 돌린 경우에는 돌리는 데까지 걸린 시간을 기록하고 돌리지 못한 경우 30초로 기록하여 돌리는 데에 걸리는 시간과 완전히 돌린 횟수를 기록하였다.

[124] 그 결과, 도 5에 나타낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우 180도 반대로 몸을 뒤집는 것을 확인하였다. 더불어, 도 6에 나타낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 SMA 모델 쥐의 경우, 주입 후 22일이 경과하자 성공률이 50%로 감소하였으나, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우, 주입 후 23일까지도 성공률이 100%로 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 7에 나타

낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우, 생후 21일 이후에는 몸을 뒤집는 데 5초 이하가 소요되었으나, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 경우 21일에는 10초 이상이, 22일 이후에는 약 25초 이상이 소요되었다.

[125] 실험예 3. Tail suspension 테스트

[126] Tail suspension(Hindlimb clasp) 테스트는 쥐의 꼬리를 매달아 놓은 경우 뒷발을 배쪽으로 움크리거나 다리를 위쪽으로 차는 현상이 발생하는 것을 측정하는 것이다. 이때, 근육과 신경에 문제가 있는 경우 다리를 차지 못하고 꼬는 특성이 나타난다. SMA, ALS 등 다양한 질병의 모델 쥐에서 상기와 같은 hindlimb clasp 현상이 관찰된다.

[127] 최대 30초 동안 꼬리를 매달고, 30초 동안 다리를 꼬는 시간을 측정하였다. 회당 총 3번 측정하였으며, 30초 수행 후 1분 정도 휴식을 취하게 한 뒤 2번 더 반복하여 평균 시간을 기록하였다. 다리를 끈 시간을 비교함으로써 행동학적 차이를 분석하였다.

[128] 그 결과, 도 8에 나타난 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 쥐의 경우 다리를 꼬지 않고 차는 것을 확인하였다. 또한, 도 9에 나타난 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 SMA 모델 쥐의 경우, 측정한 30초 중 약 20초 이상의 시간 동안 다리를 꼬고 있었으며, 다리를 위로 차는 모습이 거의 관찰되지 않았다. 그에 비해 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우, 다리를 꼬는 시간이 30초 중 3내지 4초 정도이며, 측정하는 대부분의 시간 동안 위로 다리를 차는 것을 확인할 수 있었다.

[129] 실험예 4. 동물 모델의 체중 및 생존능 확인

[130] 실시예 2와 같이 SMA 유전자를 주입한 쥐는 PND10 내지 PND14 이후에 각 실험군별로 체중(body weight)의 차이가 나타났고, PND23 이후에 운동 기능 테스트에서 가장 큰 차이가 관찰되었다.

[131] 실시예 2와 같이 SMA 유전자를 주입한 쥐에서 체중을 측정한 결과, 도 10에 나타난 것과 같이, PND10까지는 각 실험군별로 체중(body weight)의 차이가 없었으나, 그 이후에는 각 실험군별로 체중(body weight)의 차이가 나타났다. 구체적으로, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 쥐에 비해 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}를 주입한 쥐의 체중이 현저하게 증가함을 확인하였다.

[132] 또한, 도 11에 나타난 것과 같이, 아무것도 처리하지 않은 음성대조군 Type 1.5 SMA 쥐는 빨리 사망하였으나, AAV9-CMV-hSMN1를 주입한 경우는 약 4주 정도 생존하다가 죽는 것이 관찰되었다. 그에 비해 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}를 주입한 경우는 약 260일 이상 생존하는 것이 관찰되었다.

[133] 실험예 5. 실험군별 간 조직 분석

[134] 실험예 5.1. 실험군 샘플링

[135] 상기 실험예 4와 같이, 체중에 차이가 나기 시작하는 시점인 PND14, 운동 능력의 차이가 가장 크게 관찰되는 PND28에 AAV9-CMV-hSMN1 및 AAV9-CMV-

hSMN1^{K186R}을 주입한 쥐를 수득하여, CNS와 말초(periphery) 비교를 위해 뇌(brain), 척수(spinal cord), 간(liver), 근육(muscle)을 각각 떼어 내서 RIPA와 Trizol에 넣고 샘플링을 진행하였다. 근육은 장딴지근(Gastrocnemius muscle, GA) 부위를 이용하였다. 그 결과, 도 12에 나타낸 것과 같이 실험군 쥐의 간 조직을 수득할 수 있었으며, 각 조직 샘플을 이용하여 하기와 같이 분석을 진행하였다.

[136] **실험예 5.2. 웨스턴 블랏**

[137] 실험군 쥐의 뇌, 척수, 간 및 장딴지근에서 SMN 단백질의 발현량을 확인하기 위해 하기와 같이 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[138] 단백질 영동에는 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, PVDF 멤브레인에서 SMN(ms, 1:2,000)과 GAPDH(Rb, 1:1,000)를 이용하여 blotting하였다.

[139] 그 결과, 또한, 도 13 및 도 14에 나타낸 것과 같이, 뇌, 척수, 근육에서는 별다른 경향성이 보이지 않았으나, 유독 간에서는 AAV9-CMV-hSMN1을 주입한 경우 SMN이 과도하게 축적되어 있는 것이 관찰되었다.

[140] **실험예 5.3. RNA 추출 및 qRT-PCR**

[141] 실험군 쥐의 간 조직에서 SMN과 IGF1, IGFALS mRNA 발현량을 확인하기 위해 하기와 같이 qRT-PCR을 수행하였다.

[142] 조직을 Trizol reagent에 넣고 균질화(homogenization)하여 세포 용해(lysis)시킨 후, 클로로포름(Chloroform)을 넣고 상온에서 10분 동안 인큐베이션(incubation)하였다. 이후 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리(centrifugation)하여 상층액(supernatant)을 분리하고, 새 튜브로 옮긴 뒤 이소프로판올(isopropanol) 및 75% 에탄올 과정을 거쳐 RNA 펠렛을 생성하였다. 만들어진 펠렛은 DEPC-dH₂O로 녹여 RNA 농도를 정량하였다. 정량 수치를 바탕으로 동량의 RNA 및 ReverTra Ace reagent를 이용해 cDNA를 합성하고, 이를 이용해 qRT-PCR을 수행하였다. Reference gene으로는 GAPDH를 활용하였다.

[143] 그 결과, 도 15에 나타낸 것과 같이, AAV9-CMV-hSMN1을 주입한 경우 SMN의 RNA가 과도하게 축적되어 있는 것이 관찰되었다. 이러한 경향성은 도 13 및 14에 나타낸 웨스턴 블랏의 결과와 일치하였다. 또한, AAV-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 경우 AAV-CMV-hSMN1을 주입한 경우보다 간에서 IGF1, IGFALS의 발현이 더 높은 것이 관찰되었다.

[144] **실험예 5.4. 면역조직화학 분석**

[145] 실험군 쥐의 간 조직의 표현형을 분석하기 위해, 하기와 면역조직화학(Immunohistochemical, IHC) 분석을 수행하였다.

[146] 먼저, 4% PFA를 이용해 조직을 픽싱하였다. 이후 15%, 30% 수크로오스 용액으로 옮겨가면서 조직이 가라앉을 때까지 두고, 이후 가라앉은 조직을 OCT 화합물이 들어있는 튜브에 넣고 액체 질소에 넣어 급속 냉동시켰다. 냉동된 샘플을 저온유지장치(Cryostat)를 이용하여 7 μ m 절편으로 만들어 IHC를 수행하였다. IHC 과정은 다음과 같다. 1X PBS로 15분간 워싱하여 OCT를 제거하였으며, 척수

절편의 경우 차가운 메탄올에 30분 동안 넣어 추가적인 픽싱을 진행하였다. 이후 EDTA antigen retrieval buffer(1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)에 slide를 넣고 105°C에서 10분간 항원 검색(antigen retrieval)을 진행하였다. 이후 1X PBS 워싱한 절편을 블로킹 한 뒤 1차 항체(primary antibody)를 처리했다. 1차 항체는 rabbit anti-Ki67(1:500 dilution)을 사용하였으며, 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서 1x PBS 워싱후 각 1차 항체에 맞는 2차 항체(Alexa Fluor 594 염소 항-토끼 IgG(1:400))를 실온에서 1시간 처리한 뒤 DAPI가 포함되어 있는 마운팅 솔루션(mounting solution)을 넣고 커버슬립을 덮어 마무리하였다.

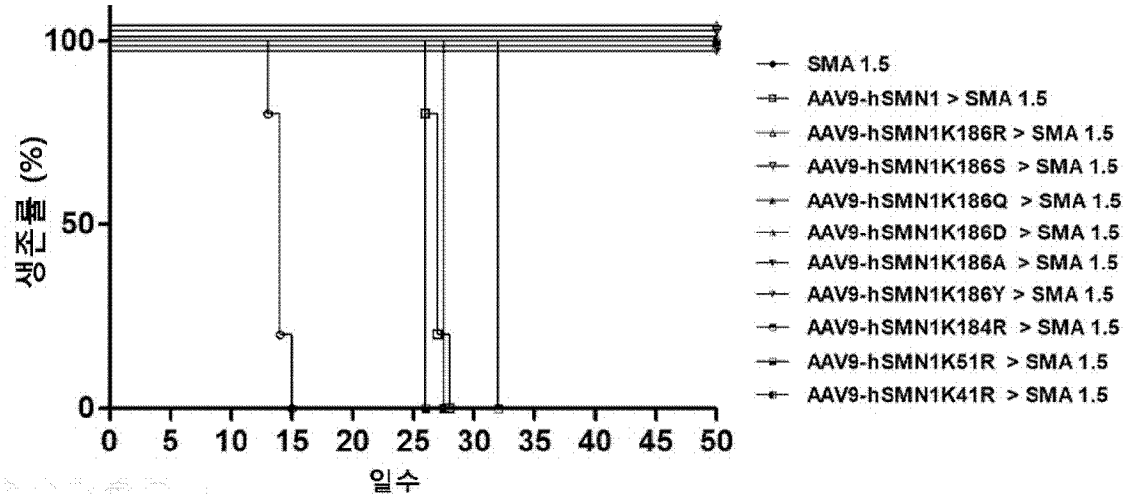
- [147] 그 결과, 도 16 및 도 17에 나타낸 것과 같이, 체중 차이가 관찰되지 않는 PND12에서는 Ki67 양성 세포의 차이가 관찰되지 않았으나 체중 및 운동능력 차이가 크게 관찰되는 PND25에서는 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 쥐의 간 조직은 AAV9-CMV-hSMN1을 주입한 쥐의 간 조직보다 Ki67 양성 간세포의 밀도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 18에 나타낸 것과 같이, Ki67 양성 세포를 정량 하였을 때 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 쥐의 간 조직은 AAV9-CMV-hSMN1을 주입한 쥐의 간 조직보다 PND12에서는 큰 차이가 없었으나 PND25에서 더 많았으며, 이러한 경향성은 도 16 및 17과 일치하였다. 이는 PND25에서 AAV9-CMV-hSMN1^{K186R}을 주입한 쥐의 간세포가 AAV9-CMV-hSMN1을 주입한 쥐의 간세포보다 증식률이 높음을 보여주었고, 또한 정상 개체의 간과 더 유사한 경향을 보였다.

청구범위

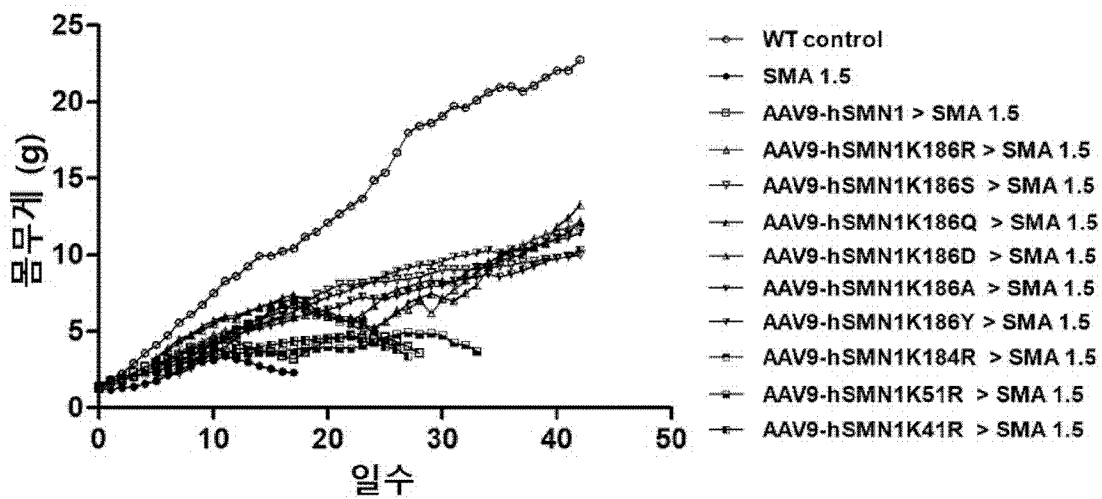
- [청구항 1] 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열에서 41번째, 51번째, 184번째 및/또는 186 번째 위치의 라이신(Lysine)이 다른 아미노산으로 치환된 인간 SMN1(Survival of motor neuron 1) 단백질 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 변이체는 서열번호 1 내지 6으로 구성된 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인간 SMN1 단백질과 비교하여 유비퀴틴화(Ubiquitination)가 저해된 것인, 인간 SMN1 단백질 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 치환된 아미노산은 알라닌(A), 알지닌(R), 아스파라진(N), 아스파르트산(D), 시스테인(C), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 글라이신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 페닐알라닌(F), 프로린(P), 세린(S), 트레오닌(T), 트립토판(W), 타이로신(Y) 및 발린(V)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 인간 SMN1 단백질 변이체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 변이체는 서열번호 7 내지 30 및 36 내지 41으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 인간 SMN1 단백질 변이체.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 인간 SMN1 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA인 것인, 인간 SMN1 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
서열번호 35 및 42 내지 49로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기서열을 포함하는 것인, 인간 SMN1 단백질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 8] 제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드가 적재된 벡터.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터인 것인, 벡터.
- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노-바이러스 연관 벡터(AAV), 렌티바이러스 벡터 또는 백시니아 벡터인 것인, 벡터.
- [청구항 11] 제8항에 있어서,
CMV 프로모터가 추가적으로 적재된 것인, 벡터.
- [청구항 12] 제8항에 있어서,

- 상기 벡터는 서열번호 33, 34 및 50 내지 57인 것인, 벡터.
- [청구항 13] 제8항 내지 제12항 중 어느 한 항의 벡터를 유효성분으로 포함하는 척수성 근위축증(SMA) 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 척수성 근위축증은 SMA 1형, SMA 2형 또는 SMA 3형인 것인, 약학 조성물.
- [청구항 15] 제13항 내지 제14항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 척수성 근위축증 치료 또는 예방 방법.
- [청구항 16] 척수성 근위축증(SMA) 치료 또는 예방을 위한 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 인간 SMN1 단백질 변이체의 용도.

[도1]

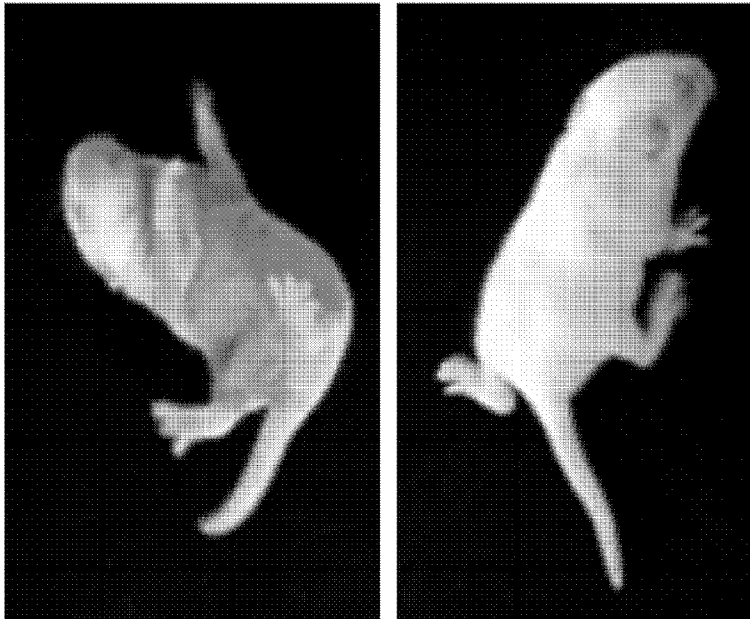


[도2]

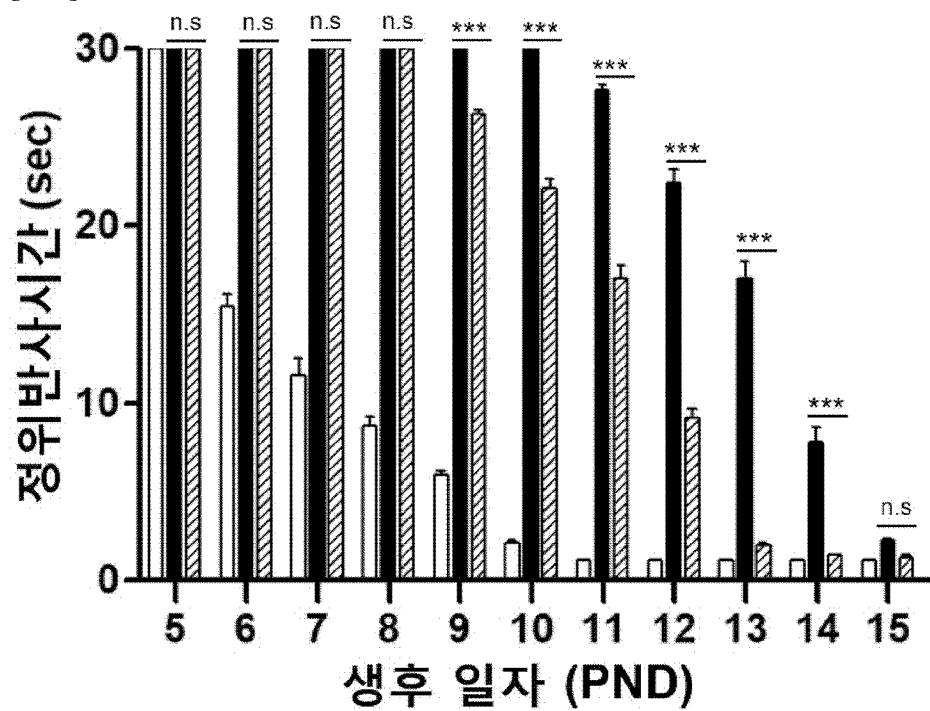


[도3]

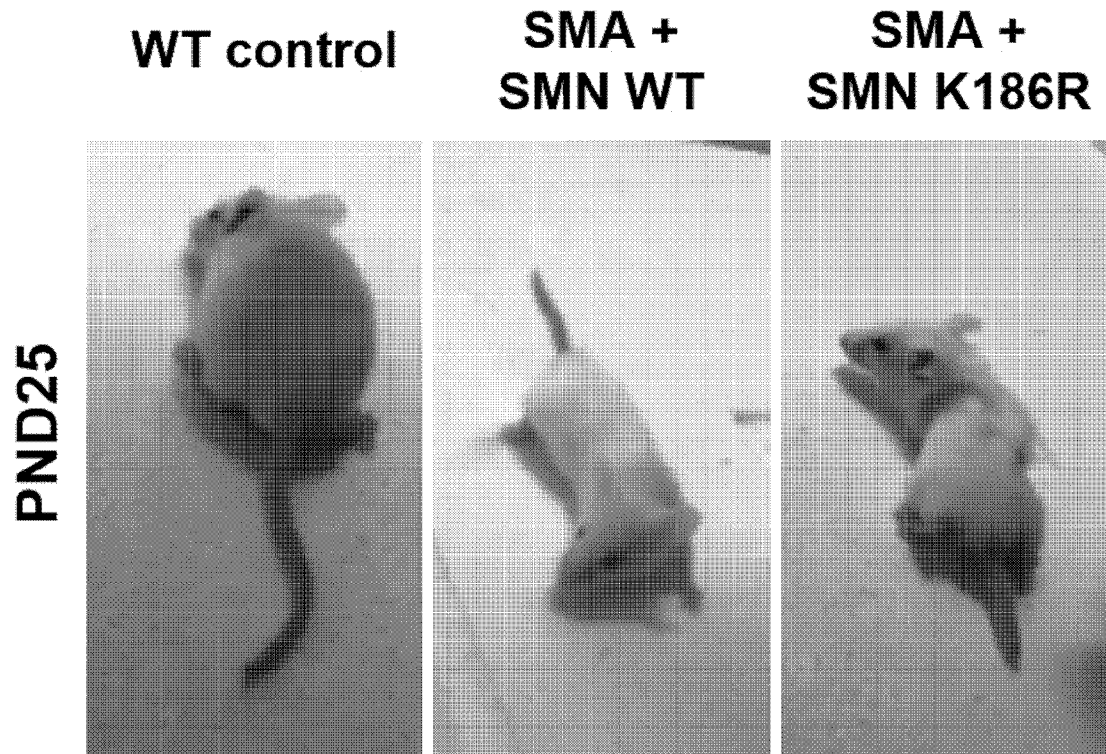
P10

SMA 1.5 +
SMNSMA 1.5 +
SMNK186R

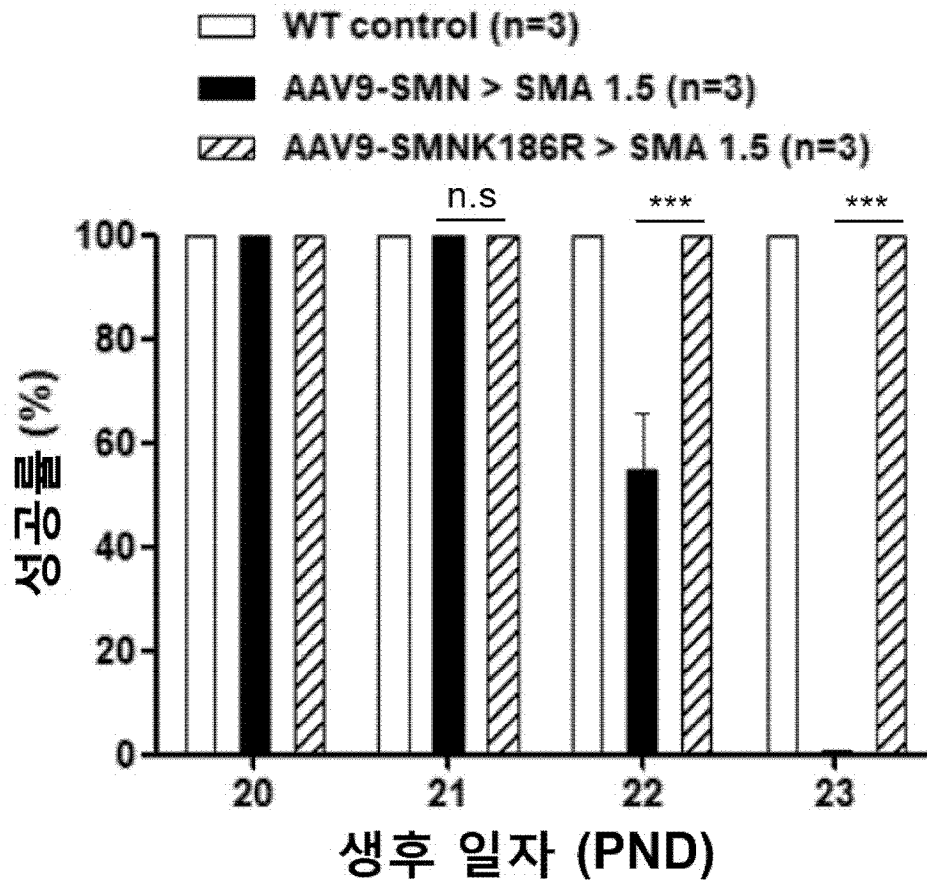
[도4]



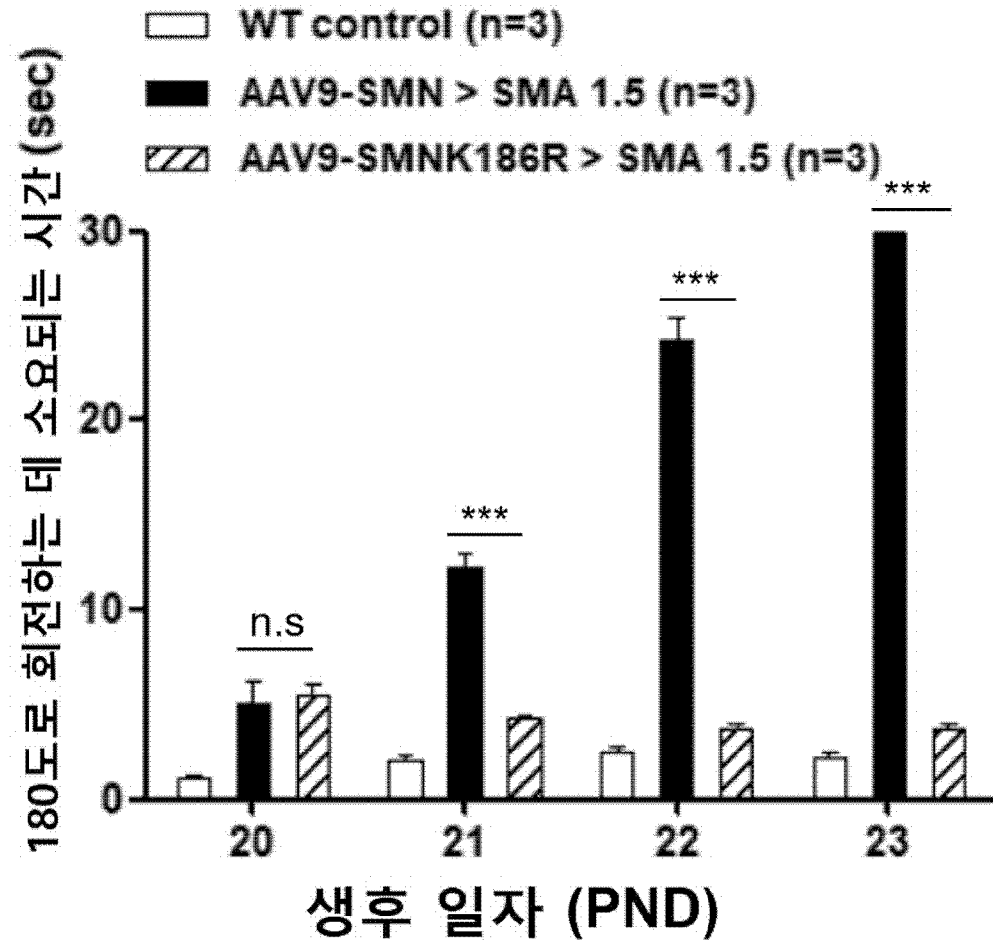
[도5]



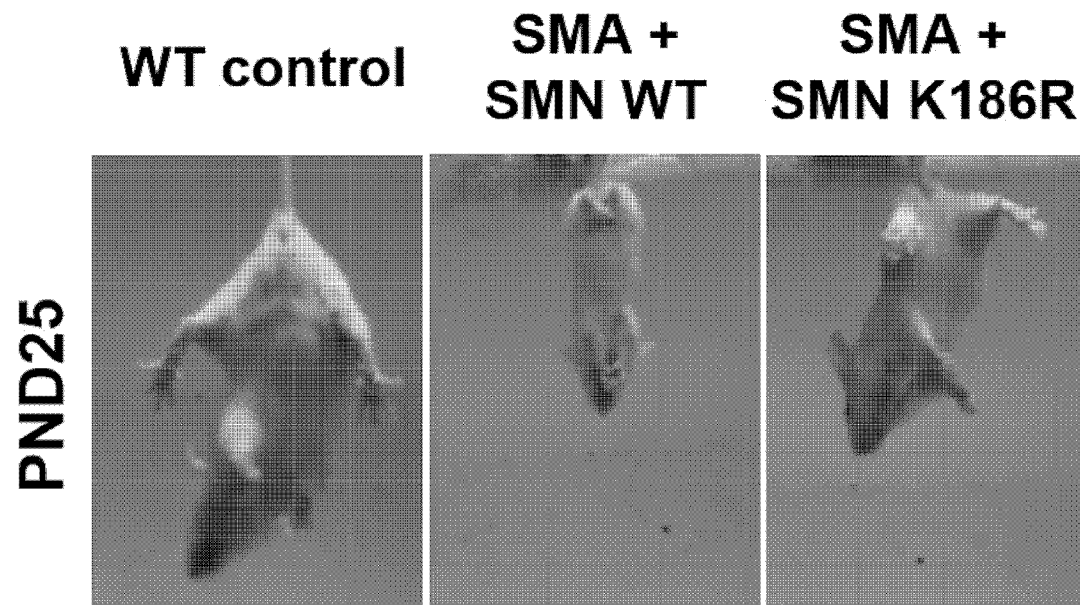
[도6]



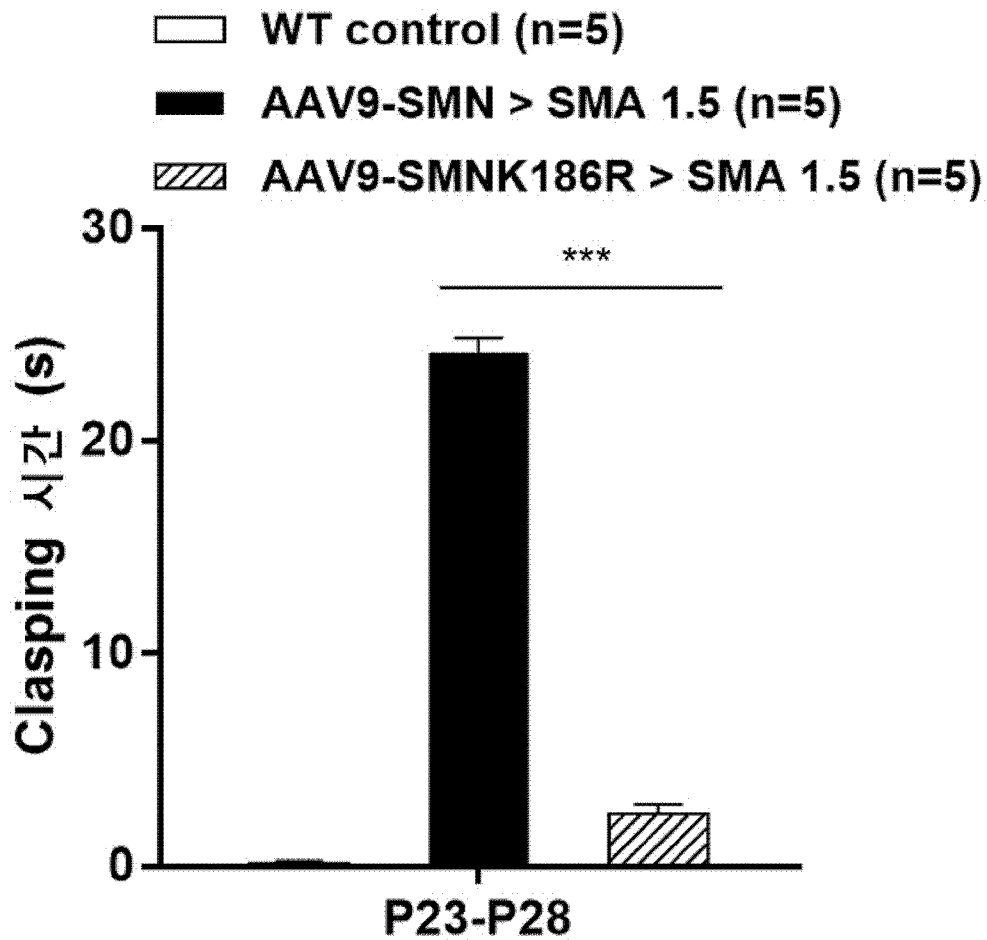
[도7]



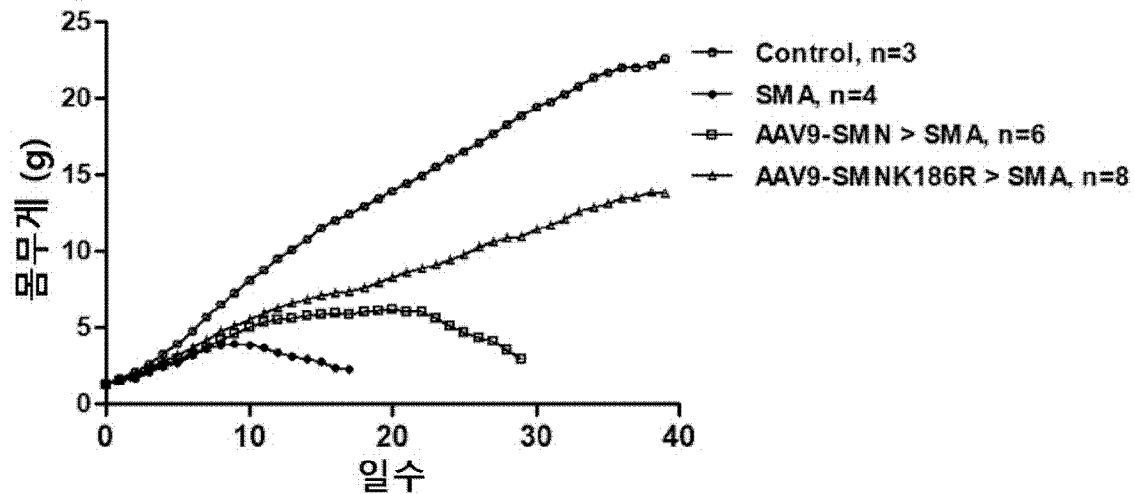
[도8]



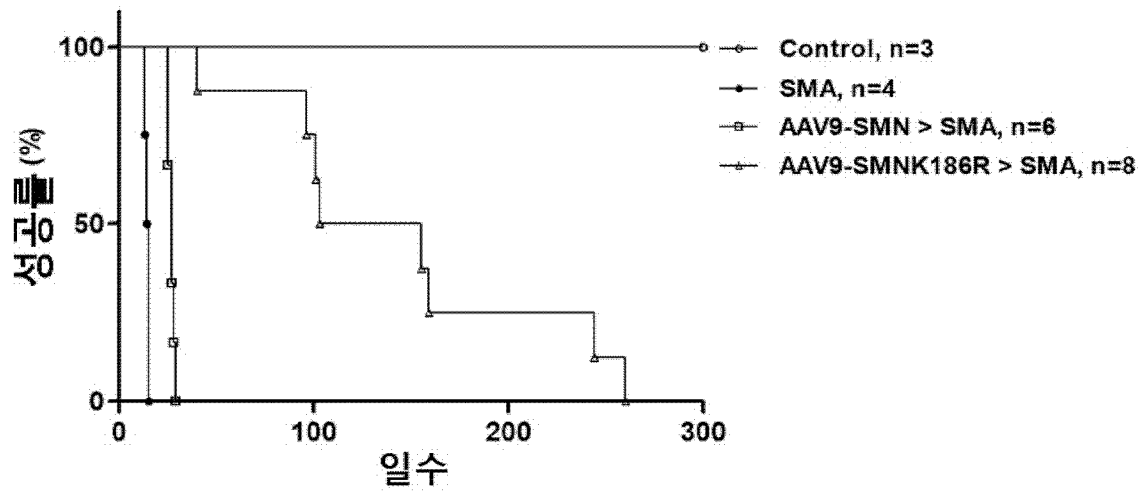
[도9]



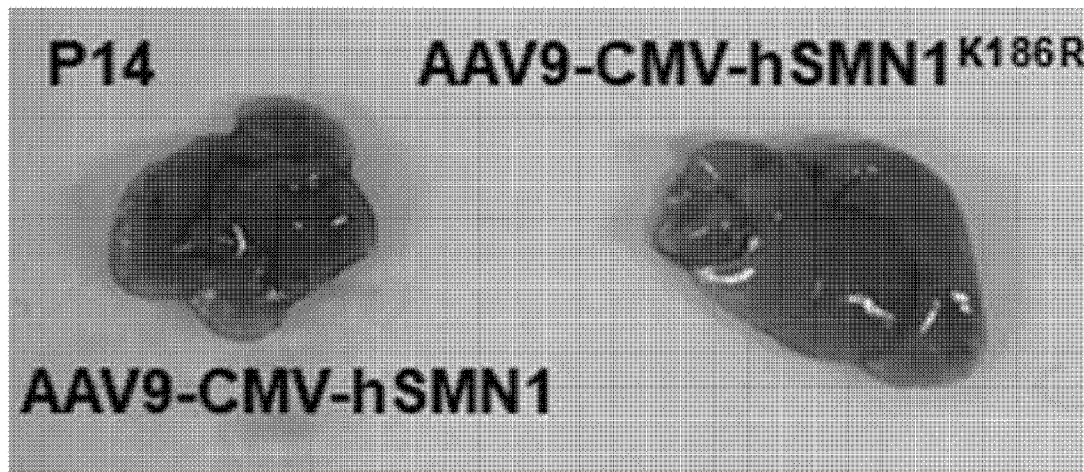
[도10]



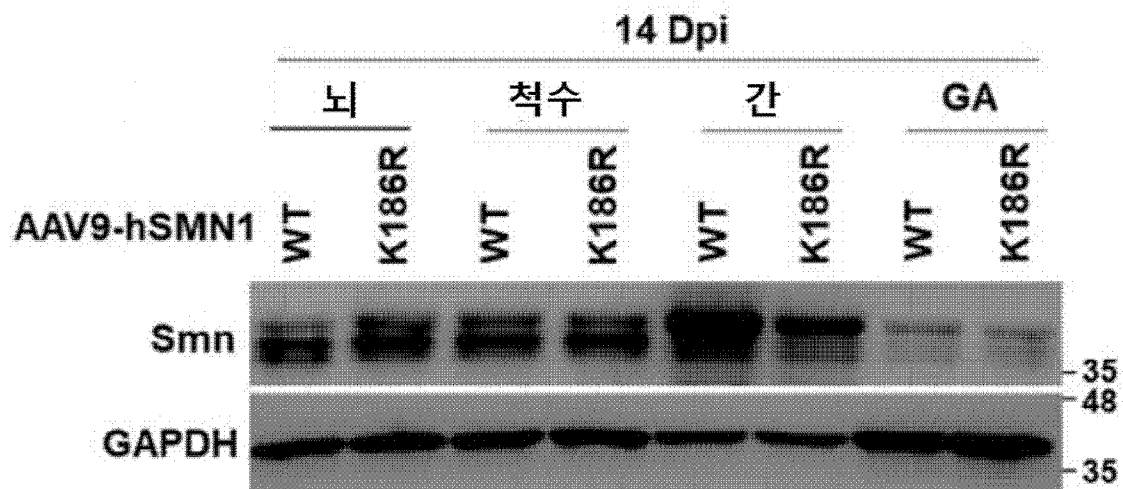
[도11]



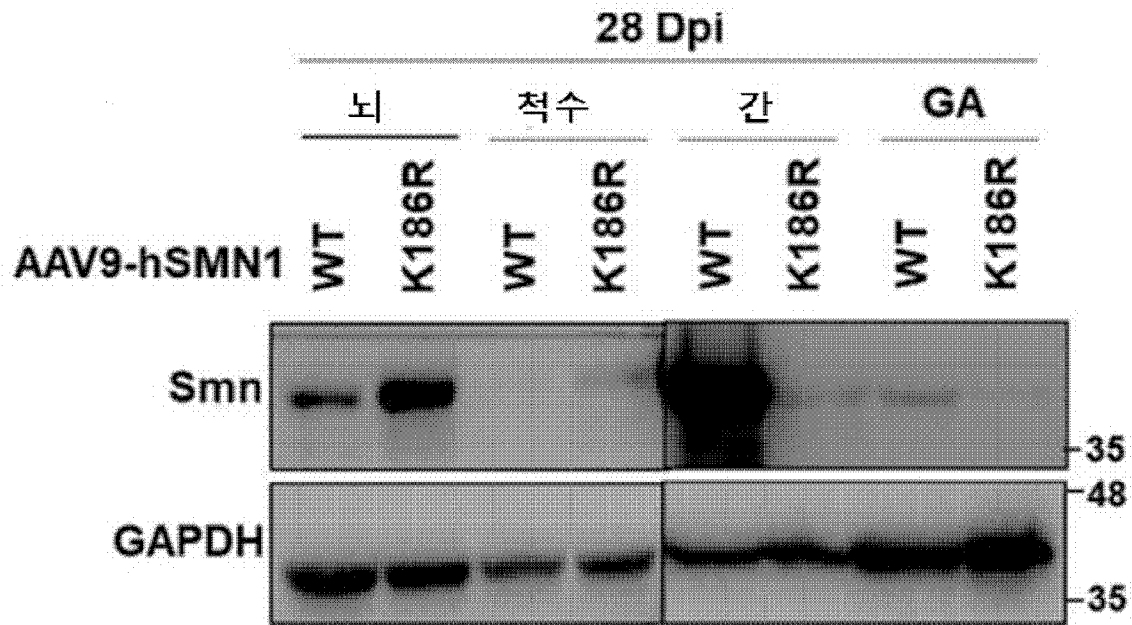
[도12]



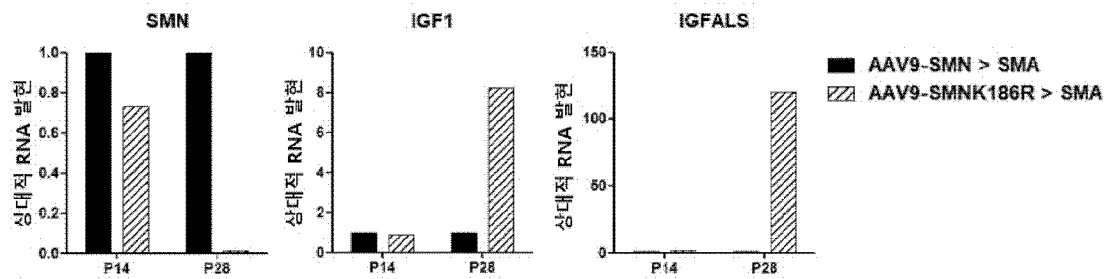
[도13]



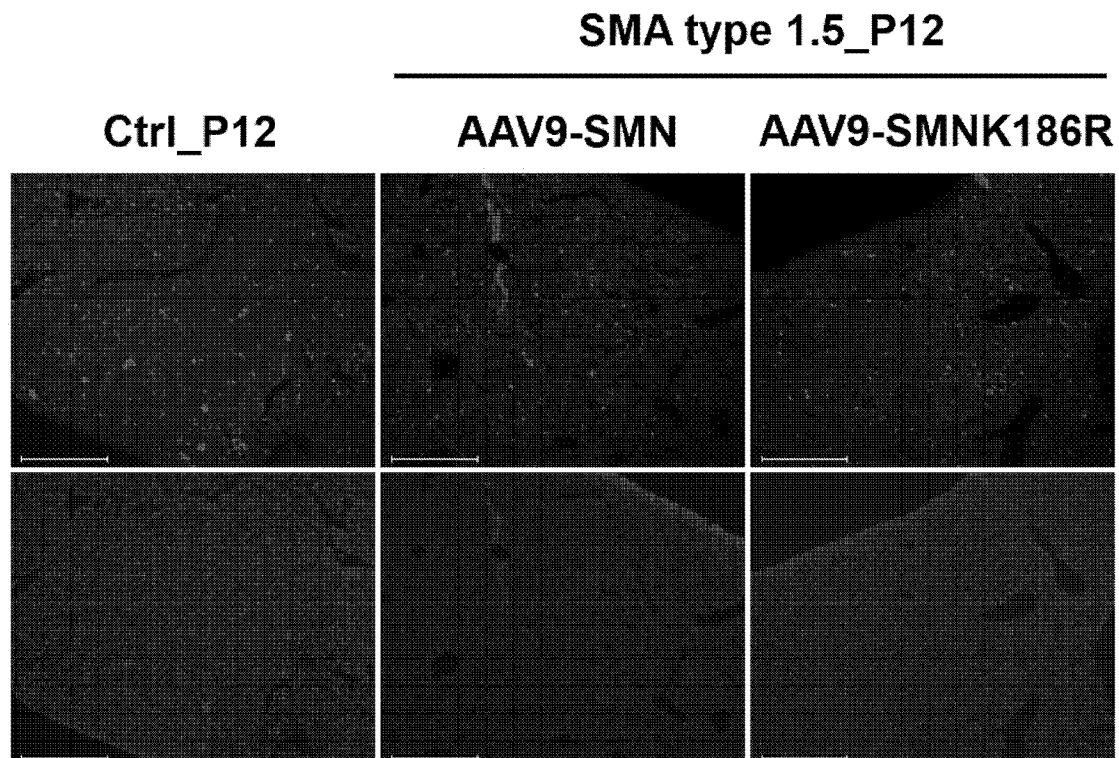
[도14]



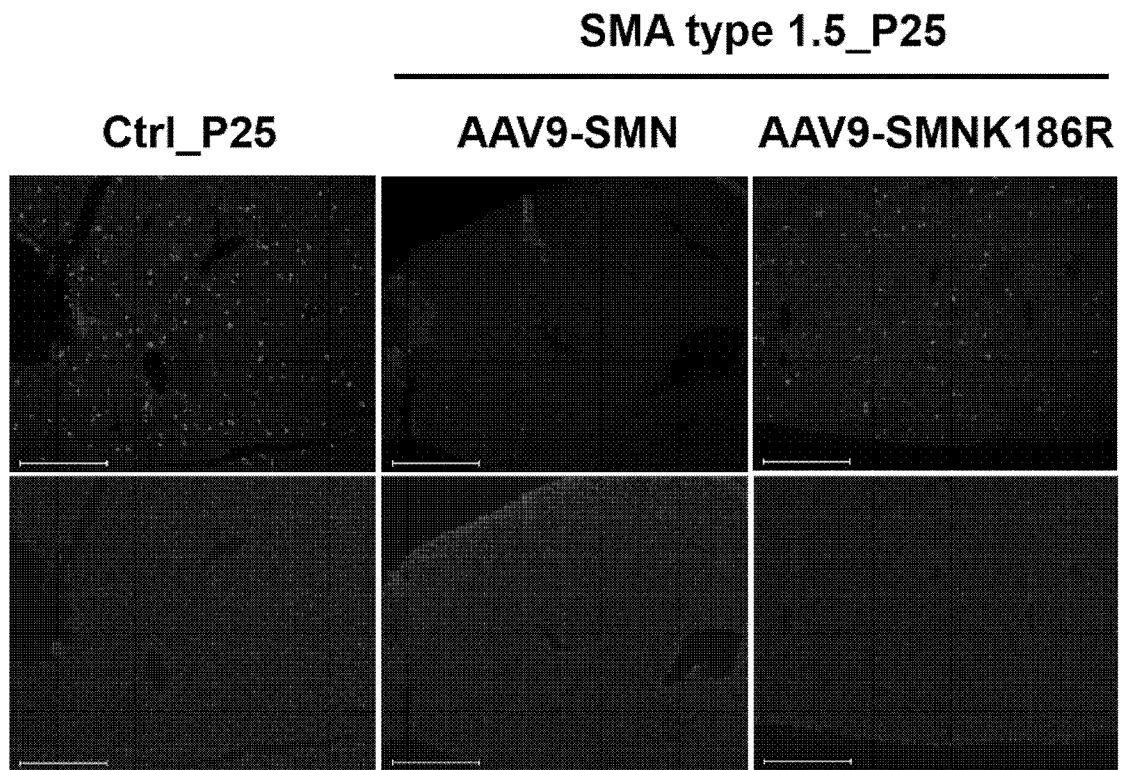
[도15]



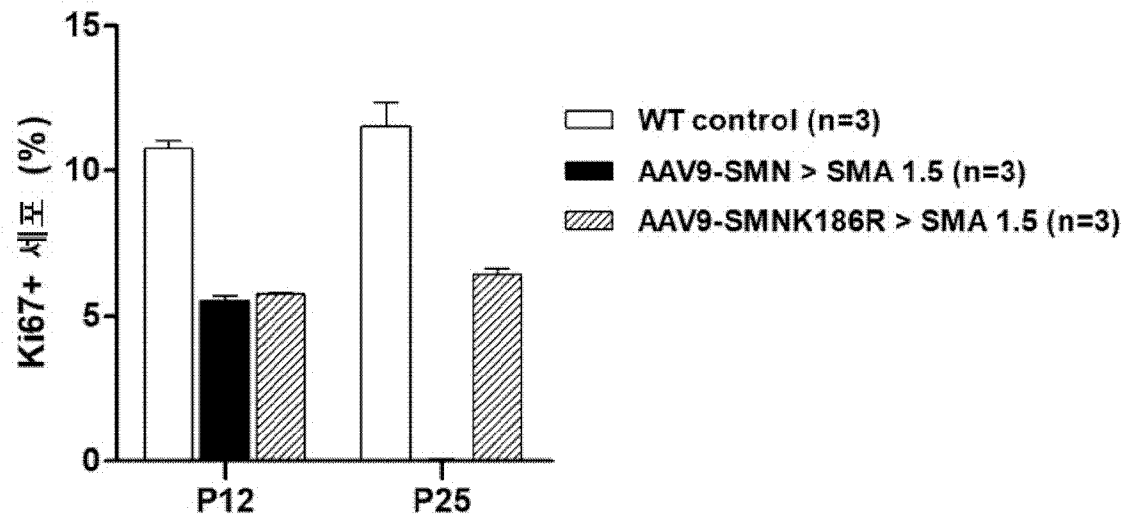
[도16]



[도17]



[도18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006293

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/47(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/47(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 35/761(2015.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 21/00(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 15/861(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy), SMN(survival of motor neuron), 단백질(protein), 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 벡터(vector), 변이체(mutant)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022-028472 A1 (HANGZHOU JIAYIN BIOTECH LTD. et al.) 10 February 2022 (2022-02-10) See claims 1 and 2; and SEQ ID NO: 33.	1-7,16
A	KR 10-1835490 B1 (GENZYME CORPORATION) 08 March 2018 (2018-03-08) See entire document.	1-7,16
A	KR 10-2018-0086266 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 30 July 2018 (2018-07-30) See entire document.	1-7,16
A	KR 10-2016-0003792 A (GENZYME CORPORATION) 11 January 2016 (2016-01-11) See entire document.	1-7,16
A	KR 10-2021-0099025 A (NOVARTIS AG) 11 August 2021 (2021-08-11) See entire document.	1-7,16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 August 2023

Date of mailing of the international search report

17 August 2023

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006293

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/006293

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 15 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: **9-12, 14**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 9-12 and 14 refer to multiple dependent claims not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: **8, 13, 15**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006293

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
WO	2022-028472	A1	10 February 2022	AU	2021-323289	A1	23 March 2023
				CA	3190601	A1	10 February 2022
				EP	4192518	A1	14 June 2023
				KR	10-2023-0044522	A	04 April 2023
KR	10-1835490	B1	08 March 2018	BR	PI1010868	A2	12 June 2018
				CA	2759801	A1	11 November 2010
				CA	2759801	C	02 April 2019
				CN	102459611	A	16 May 2012
				CN	102459611	B	09 November 2016
				CN	107083400	A	22 August 2017
				CY	1120982	T1	11 December 2019
				DK	2424991	T3	17 September 2018
				DK	3421603	T3	10 January 2022
				EP	2424991	A1	07 March 2012
				EP	2424991	B1	06 June 2018
				EP	3421603	A1	02 January 2019
				EP	3421603	B1	06 October 2021
				EP	3988660	A1	27 April 2022
				ES	2686504	T3	18 October 2018
				ES	2903127	T3	31 March 2022
				HR	P20181423	T1	30 November 2018
				HR	P20212024	T1	01 April 2022
				HU	E039345	T2	28 December 2018
				HU	E057606	T2	28 May 2022
				JP	2012-526046	A	25 October 2012
				JP	2016-052309	A	14 April 2016
				JP	2018-148927	A	27 September 2018
				JP	5879256	B2	08 March 2016
				JP	6397391	B2	26 September 2018
				KR	10-2018-0027619	A	14 March 2018
				MX	2011011594	A	18 November 2011
				MX	2018006955	A	12 November 2020
				MX	341073	B	05 August 2016
				MX	356669	B	08 June 2018
				PL	2424991	T3	30 November 2018
				PL	3421603	T3	14 February 2022
				RU	2011149094	A	10 June 2013
				RU	2016140850	A	14 December 2018
				RU	2016140850	A3	25 November 2019
				RU	2603740	C2	27 November 2016
				RU	2743398	C2	18 February 2021
				SG	10201404528	A	30 October 2014
				SG	10202109219	A	28 October 2021
				SG	175409	A1	29 December 2011
				SI	2424991	T1	30 November 2018
				SI	3421603	T1	28 February 2022
				US	10369193	B2	06 August 2019
				US	2013-0287736	A1	31 October 2013
				US	2016-0051699	A1	25 February 2016
				US	2017-0087212	A1	30 March 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/006293

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				US	2020-0384076 A1	10 December 2020
				US	2023-0084580 A1	16 March 2023
				US	2023-0135379 A1	04 May 2023
				US	9415119 B2	16 August 2016
				WO	2010-129021 A1	11 November 2010
KR	10-2018-0086266	A	30 July 2018	AU	2016-370630 A1	28 June 2018
				AU	2016-370630 B2	13 April 2023
				BR	112018011975 A2	11 December 2018
				CA	3008280 A1	22 June 2017
				CN	109072254 A	21 December 2018
				EP	3394270 A1	31 October 2018
				JP	2018-537984 A	27 December 2018
				JP	7082050 B2	07 June 2022
				MA	44119 A	31 October 2018
				MX	2018007234 A	09 November 2018
				US	2018-0353624 A1	13 December 2018
				US	2022-0265861 A1	25 August 2022
				WO	2017-106354 A1	22 June 2017
				ZA	201803956 B	24 April 2019
				KR	10-2116378 B1	01 June 2020
KR	10-2021-0099025	A	11 August 2021	AU	2019-389047 A1	20 May 2021
				CA	3116630 A1	04 June 2020
				CN	113226380 A	06 August 2021
				EP	3886919 A1	06 October 2021
				JP	2022-511776 A	01 February 2022
				MX	2021006359 A	11 August 2021
				TW	202039859 A	01 November 2020
				US	2022-0001028 A1	06 January 2022
				WO	2020-113034 A1	04 June 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 14/47(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 14/47(2006.01); A61K 31/7088(2006.01); A61K 35/761(2015.01); A61K 48/00(2006.01); A61P 21/00(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 15/861(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy), SMN(survival of motor neuron), 단백질(protein), 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 벡터(vector), 변이체(mutant)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2022-028472 A1 (HANGZHOU JIAYIN BIOTECH LTD. 등) 2022.02.10 청구항 1, 2; 서열번호 33	1-7,16
A	KR 10-1835490 B1 (젠자임 코퍼레이션) 2018.03.08 전체 문헌	1-7,16
A	KR 10-2018-0086266 A (더 트러스트스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아) 2018.07.30 전체 문헌	1-7,16
A	KR 10-2016-0003792 A (젠자임 코퍼레이션) 2016.01.11 전체 문헌	1-7,16
A	KR 10-2021-0099025 A (노파르티스 아게) 2021.08.11 전체 문헌	1-7,16
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년08월16일(16.08.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년08월17일(17.08.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 15는 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여
국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☒ 청구항: **9-12, 14**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관
련됩니다. 구체적으로는,
청구항 9-12, 14는 PCT 규칙 제 6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 다수 종속청구항을 인용하고 있
습니다.
3. ☒ 청구항: **8, 13, 15**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2022-028472 A1	2022/02/10	AU 2021-323289 A1	2023/03/23
		CA 3190601 A1	2022/02/10
		EP 4192518 A1	2023/06/14
		KR 10-2023-0044522 A	2023/04/04
KR 10-1835490 B1	2018/03/08	BR PI1010868 A2	2018/06/12
		CA 2759801 A1	2010/11/11
		CA 2759801 C	2019/04/02
		CN 102459611 A	2012/05/16
		CN 102459611 B	2016/11/09
		CN 107083400 A	2017/08/22
		CY 1120982 T1	2019/12/11
		DK 2424991 T3	2018/09/17
		DK 3421603 T3	2022/01/10
		EP 2424991 A1	2012/03/07
		EP 2424991 B1	2018/06/06
		EP 3421603 A1	2019/01/02
		EP 3421603 B1	2021/10/06
		EP 3988660 A1	2022/04/27
		ES 2686504 T3	2018/10/18
		ES 2903127 T3	2022/03/31
		HR P20181423 T1	2018/11/30
		HR P20212024 T1	2022/04/01
		HU E039345 T2	2018/12/28
		HU E057606 T2	2022/05/28
		JP 2012-526046 A	2012/10/25
		JP 2016-052309 A	2016/04/14
		JP 2018-148927 A	2018/09/27
		JP 5879256 B2	2016/03/08
		JP 6397391 B2	2018/09/26
		KR 10-2018-0027619 A	2018/03/14
		MX 2011011594 A	2011/11/18
		MX 2018006955 A	2020/11/12
		MX 341073 B	2016/08/05
		MX 356669 B	2018/06/08
		PL 2424991 T3	2018/11/30
		PL 3421603 T3	2022/02/14
		RU 2011149094 A	2013/06/10
		RU 2016140850 A	2018/12/14
		RU 2016140850 A3	2019/11/25
		RU 2603740 C2	2016/11/27
		RU 2743398 C2	2021/02/18
		SG 10201404528 A	2014/10/30
		SG 10202109219 A	2021/10/28
		SG 175409 A1	2011/12/29
		SI 2424991 T1	2018/11/30
		SI 3421603 T1	2022/02/28
		US 10369193 B2	2019/08/06
		US 2013-0287736 A1	2013/10/31
		US 2016-0051699 A1	2016/02/25
		US 2017-0087212 A1	2017/03/30

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2020-0384076 A1	2020/12/10
		US 2023-0084580 A1	2023/03/16
		US 2023-0135379 A1	2023/05/04
		US 9415119 B2	2016/08/16
		WO 2010-129021 A1	2010/11/11
KR 10-2018-0086266 A	2018/07/30	AU 2016-370630 A1	2018/06/28
		AU 2016-370630 B2	2023/04/13
		BR 112018011975 A2	2018/12/11
		CA 3008280 A1	2017/06/22
		CN 109072254 A	2018/12/21
		EP 3394270 A1	2018/10/31
		JP 2018-537984 A	2018/12/27
		JP 7082050 B2	2022/06/07
		MA 44119 A	2018/10/31
		MX 2018007234 A	2018/11/09
		US 2018-0353624 A1	2018/12/13
		US 2022-0265861 A1	2022/08/25
		WO 2017-106354 A1	2017/06/22
		ZA 201803956 B	2019/04/24
KR 10-2016-0003792 A	2016/01/11	KR 10-2116378 B1	2020/06/01
KR 10-2021-0099025 A	2021/08/11	AU 2019-389047 A1	2021/05/20
		CA 3116630 A1	2020/06/04
		CN 113226380 A	2021/08/06
		EP 3886919 A1	2021/10/06
		JP 2022-511776 A	2022/02/01
		MX 2021006359 A	2021/08/11
		TW 202039859 A	2020/11/01
		US 2022-0001028 A1	2022/01/06
		WO 2020-113034 A1	2020/06/04