(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0044726
(43) 공개일자 2022년04월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 47/60* (2017.01) *A61K 38/51* (2006.01)
*A61K 45/06* (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
*A61K 47/26* (2017.01) *A61K 9/19* (2006.01)
*A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 47/60* (2017.08)
*A61K 38/51* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7002804
(22) 출원일자(국제) 2020년06월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/039870
(87) 국제공개번호 WO 2020/264333
국제공개일자 2020년12월30일
(30) 우선권주장
62/866,810 2019년06월26일 미국(US)
62/983,860 2020년03월02일 미국(US)

(71) 출원인
**트래비어 써래퓨틱스 스위처랜드 게엠베하**
스위스 8640 래퍼스윌-요나 쥐르처슈트라쎄 6 젠트룸 소넨호프
**더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 콜로라도, 어 바디 코퍼레이트**
미합중국, 80203 콜로라도, 덴버, 8 플로어, 그랜트 스트릿1800
(72) 발명자
**버블릴 에레즈**
이스라엘 4481600 이티에스 에프라임 하돌레브 12비
**글래빈 프랭크**
미국 매사추세츠주 02478 벨몬트 킬톤 스트리트 136
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**장훈**

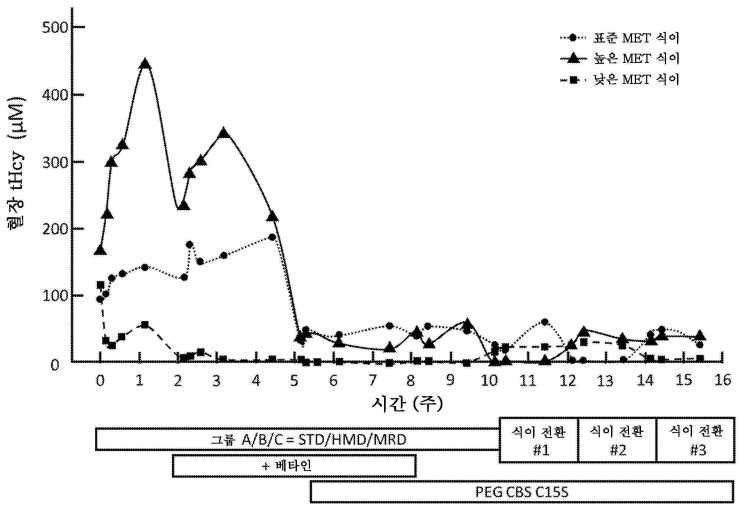
전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **호모시스틴요증 치료용 효소 치료요법을 위한 페길화된 시스타티오닌 베타 신타제**

## (57) 요 약

본원의 개시내용은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 페길화된 CBS 단백질을 포함하는 약물 생성물을 위한 제형을 제공한다. 용량 및 투여 용법은 이를 필요로 하는 대상체에서 호모시스틴뇨능의 치료를 위해 제공된다. 추가로, 용량 및 투여 용법은 또한 이를 필요로 하는 대상체에서 호모시스테인 (Hcy)의 수준을 감소시키거나, 시스테인(Cys) 및/또는 시스타티오닌(Cth)의 수준을 증가시키기 위해 제공된다.

## 대 표 도



(52) CPC특허분류
*A61K 45/06* (2013.01)
*A61K 47/02* (2013.01)
*A61K 47/26* (2013.01)
*A61K 9/19* (2013.01)
*A61P 43/00* (2018.01)
*C12Y 402/01022* (2013.01)
(72) 발명자
**셀로스-모라 마르시아**
미국 매사추세츠주 01985 웨스트 뉴버리 베일리즈 레인 6
**마잔 토마스**
미국 콜로라도주 80011 오로라 에이피티. #302 이달리아 코트 100
**크라우스 얀 피.**
(사망)
**워너 랜디**
독일 82152 마르틴스리드 프라운호퍼슈트라쎄 18비 코리올리스 파르마 리서치 게엠베하
**카우세빅 오르한**
독일 82152 마르틴스리드 프라운호퍼슈트라쎄 18비 코리올리스 파르마 리서치 게엠베하

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

(a) 서열번호 1을 포함하는 단리된 시스타티오닌 β-신타제 (CBS) 단백질; 및 (b) 상기 CBS 단백질에 공유적으로 결합된 PEG 분자

를 포함하는 약물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PEG 분자가 ME-200GS인, 약물.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항의 약물 및 약제학적으로 허용되는 부형제, 보조제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

### 청구항 4

제3항의 약제학적 조성물의 제형으로서, 상기 제형이 동결건조된, 제형.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 재구성시, 재구성된 액체 제형이

(a) 약 20-30mg/ml 농도의 약물;

(b) 약 150mM의 인산칼륨; 및

(c) 약 8%(w/v)의 트레할로스

를 포함하는 동결건조된 제형.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제형의 유닛 용량이

(a) 약 25mg의 약물; 및

(b) 1mL의 물

을 포함하는, 재구성된 제형.

### 청구항 7

대상체에서 호모시스틴뇨증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법이 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 약제학적 조성물의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 치료학적 유효량이 약 0.25mg/kg 내지 약 10mg/kg의 범위로부터 선택되는 용량인, 방법.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 용량이 약 0.33mg/kg인, 방법.

### 청구항 10

제8항에 있어서, 상기 용량이 약 0.66mg/kg인, 방법.

**청구항 11**

제8항에 있어서, 상기 용량이 1.0mg/kg인, 방법.

**청구항 12**

제8항에 있어서, 상기 용량이 약 1.5mg/kg인, 방법.

**청구항 13**

제7항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 피리독신, 비타민 B6 및 베타인으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 14**

제7항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 메티오닌 (Met)-제한 식이 요법 중에 있는, 방법.

**청구항 15**

제7항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항-혈소판 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 상기 항-혈소판 제제가 와파린 혈액 희석제(thinner) 또는 항-응고제인, 방법.

**청구항 17**

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 3일 마다 약 1회 수행되는, 방법.

**청구항 18**

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 하루 당 약 1 회 수행되는, 방법.

**청구항 19**

제7항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 주당 약 1회 수행되는, 방법.

**청구항 20**

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 6주동안 반복되는, 방법.

**청구항 21**

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 3개월 동안 반복되는, 방법.

**청구항 22**

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 6개월 동안 반복되는, 방법.

**청구항 23**

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 6개월 이상 동안 반복되는, 방법.

**청구항 24**

제7항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 상기 대상체의 나머지 일생 동안 반복되는, 방법.

**청구항 25**

대상체에서 호모시스틴뇨증(Hcy)의 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법이 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 약제학적 조성물의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 약 80μM 미만인, 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 10%까지 감소되는, 방법.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 20%까지 감소되는, 방법.

**청구항 29**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 30%까지 감소되는, 방법.

**청구항 30**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 40%까지 감소되는, 방법.

**청구항 31**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 50%까지 감소되는, 방법.

**청구항 32**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 60%까지 감소되는, 방법.

**청구항 33**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 70%까지 감소되는, 방법.

**청구항 34**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 80%까지 감소되는, 방법.

**청구항 35**

제25항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 최대 90%까지 감소되는, 방법.

**청구항 36**

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Hcy 수준이 상기 투여 단계 후 약 10μM 내지 약 20μM의 범위 내에 있는, 방법.

**청구항 37**

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Hcy 수준이 상기 투여 단계 후 10μM 미만인, 방법.

**청구항 38**

제25항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Hcy의 수준이 상기 투여 단계 후 약 55μM인, 방법.

**청구항 39**

제25항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료학적 유효량이 약 0.25mg/kg 내지 약 10mg/kg의 범위로부터 선택되는 용량인, 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 0.33mg/kg인, 방법.

**청구항 41**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 0.66mg/kg인, 방법.

**청구항 42**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 1.0mg/kg인, 방법.

**청구항 43**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 1.5mg/kg인, 방법.

**청구항 44**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 7.0mg/kg인, 방법.

**청구항 45**

제39항에 있어서, 상기 용량이 약 10mg/kg인, 방법.

**청구항 46**

제39항에 있어서, 상기 용량이 10mg/kg 미만인, 방법.

**청구항 47**

제25항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 피리독신, 비타민 B6 및 베타인으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 48**

제25항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 메티오닌 (Met)-제한 식이 요법 중에 있는, 방법.

**청구항 49**

제25항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 항-혈소판 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 상기 항-혈소판 제제가 와파린 혈액 희석제(thinner) 또는 항-응고제인, 방법.

**청구항 51**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 3일 마다 약 1회 수행되는, 방법.

**청구항 52**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 하루 당 약 1회 수행되는, 방법.

**청구항 53**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 주당 약 1회 수행되는, 방법.

**청구항 54**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 6주동안 반복되는, 방법.

**청구항 55**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 3개월 동안 반복되는, 방법.

**청구항 56**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 약 6개월 동안 반복되는, 방법.

**청구항 57**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 6개월 이상 동안 반복되는, 방법.

**청구항 58**

제25항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여 단계가 상기 대상체의 나머지 일생 동안 반복되는, 방법.

**청구항 59**

대상체에서 시스테인(Cys)의 수준을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법이 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 약제학적 조성물의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 60**

대상체에서 시스타티오닌(Cth)의 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법이 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 약제학적 조성물의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 61**

대상체의 안구계, 골격계, 혈관계, 및/또는 중추신경계와 관련된 음성의 임상 결과를 치료하거나, 완화시키거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법이 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 치료학적 유효량의 약제학적 조성물의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] **[0001]** 본 출원은 2019년 6월 26일자로 Drug Product For Enzyme Replacement Therapy for Treatment of Homocystinuria의 발명의 명칭으로 출원된 제62/866,810호, 및 2020년 3월 2일자로 Drug Product For Enzyme Therapy for Treatment of Homocystinuria의 발명의 명칭으로 출원된 제62/983,860호에 대한 우선권을 주장하고, 이의 각각의 내용은 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참조**

[0004] **[0002]** 본 출원은 전자 포맷으로 서열 목록과 함께 출원한다. 2089_1005PCT_SL.txt 파일명의 서열 목록 파일을 2020년 6월 26일자로 생성하였고 크기는 18,401 바이트이다. 서열 목록의 전자 포맷의 정보는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

### *배 경 기 술*

[0005] **[0003]** 본원의 개시내용은 본원에 기재된 약물 생성물을 사용한 호모시스틴뇨증의 치료를 위한 효소 치료요법을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0006] **발명의 배경**

[0007] **[0004]** 고전적 호모시스틴뇨증(HCU) 또는 HCU 1형으로서도 공지된 시스타티오닌 β-신타제 결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)은 어린이와 성인 모두에게 영향을 미치는 희귀 질환이다. CBSDH는 시스타티오닌 β-신타제(CBS) 효소의 활성 감소 또는 부재로 인해 소변, 조직 및 혈장에서 과량의 호모시스테인(Hcy) 화합물을 특징으로 하는 희귀 상염색체 열성 대사 병태이다(문헌참조: Kraus *et al.*, In: Carmel R, Jacobsen DW, eds. Homocysteine in Health and Disease. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2001:223-243; Sacharow *et al.*, Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al, eds. GeneReviewsTM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2017; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0008] **[0005]** CBSDH의 진단은 문헌(참조: Sacharow et al.)에 기재된 바와 같이 CBS 유전자의 분자 유전학적 시험에 의해 확인될 수 있다. CBS는 식이물 중 단백질에 존재하는 황 아미노산 메티오닌(Met)의 대사 내 효소이다(문헌

참조: Maclean *et al.* J Biol Chem. 2012;287(38):31994-32005, 이는 전문이 본원에 참조로 인용된다). 따라서, CBSDH는 또한 혈장 중 현저히 증가된 총 메티오닌의 농도를 측정함에 의해 진단될 수 있다. 이들 상승된 아미노산 발견은 감소된 CBS 효소 활성의 검출 또는 시스타티오닌 β-신타제를 암호화하는 유전자에서 이대립형질(biallelic) 병원성 변이체의 검출에 의해 입증될 수 있다(문헌참조: Picker *et al.*, Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. 2004 Jan 15 [Updated 2014 Nov 13]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, *et al.*, eds. GeneReviewsTM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016, available from: ncbi.nlm.nih.gov, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다). CBS 결핍은 또한 감소된 수준의 시스타티오닌 (Cth) 및 시스테인 (Cys)을 유도한다(문헌참조: Veeranki *et al.* Int J Mol Sci. 2013 Jul 18; 14(7):15074-91, 이는 본원에 이의 전문이 참조로 인용됨).

[0009] **[0006]** CBSDH는 하기를 기준으로 의심될 수 있다(문헌참조: Picker *et al.* 2014): 1) 수정체전위증(눈의 수정체 이탈) 및/또는 심각한 근시, 쇠약한 체형(키가 크고 날씬한), 골격 이상, 조기 발병 골다공증 및/또는 혈전색전증, 설명할 수 없는 발달 지연/지적 장애를 포함한 임상 소견; 2) 고메티오닌혈증에 대한 신생아 스크리닝 또는 특히 CBS 결핍에 대한 양성 가족력은 증상 전 환자 식별로 이어질 수 있다(문헌참조: Yap et al. J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-47, 이는 전문이 본원에 참조로 포함됨) ); 3) 가족력. 환자들 중에 이들 임상 징후 및 증상 발병 연령 모두에서는 상당한 가변성이 있다. 현재 스크리닝 근접법은 일반적으로 덜 중증의 CBS 결핍을 갖는 신생아를 검출하지 못하고, 단지 보다 중증의 CBSDH를 소수의 환자를 검출한다(문헌참조: Huemer *et al.* J Inherit Metab Dis. 2015 Nov; 38(6):1007-19; Yap, Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13; Schiff *et al.* Neuropediatrics. 2012 Dec;43(6):295-304; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 황 대사의 가장 통상적인 유전학적 장애가 있고, 전세계적으로 평가된 유병률은 1:200,000 내지 1:335,000이다. 황 대사 경로에서, 필수 아미노산 L-메티오닌은 Hcy로 대사되고, 이어서 2단계 트랜스-황화로 먼저 Cth로 및 최종적으로 Cys로 대사된다. CBS는 주로 Hcy를 Cth로 촉매하는 간 및 콩팥에서 발견된다. 과량의 Hcy는 베타인-Hcy 5-메틸 트랜스퍼라제에 의해 메티오닌으로 재메틸화될 수 있고 또한 혈장 Met의 수준을 상승시킨다.

[0010] **[0007]** 일부 환자들은 태생 직후 질환을 갖는 것으로 진단되지만, 흔히, CBSDH의 진단은 이후 고전적 임상 증상이 발병된 후에 생활에서 나타난다(문헌참조: Huemer *et al.* J Inherit Metab Dis. 2015 Nov, 38(6):1007-19; Yap, Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13; 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다). CBSDH는 발달 지연/지적 장애, 수정체전위증 및/또는 중증 근시, 골격 이상(팔다리의 과도한 높이 및 길이) 및 혈전색전증을 특징으로 한다. 환자들 중에 이들 임상 징후 모두에서는 상당한 가변성이 있다.

[0011] **[0008]** 정상의 총 호모시스테인(tHcy) 수준은 연령, 성별 및 영양 상태에 따라 다양하지만, 전형적으로 4.5 내지 11 μmol/L의 범위이다(문헌참조: Quest Diagnostics Reference Range; questdiagnostics.com, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 남성은 여성 보다 약간 높은 (1 내지 2 μmol/L까지) tHcy 수준을 갖는 경향이 있고, 평균 값의 대략 2배는 어린이 내지 80세 연령의 환자에서 관찰된다(문헌참조: see Refsum *et al.* Clin Chem 2004;50:3-32, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 폴레이트-보충된 집단에서, tHcy 수준의 상한 (97.5%)은 <65세의 성인에서 대략 12 μmol/L 및 65세 초과의 성인에서 16 μmol/L이다. 많은 CBSDH 환자는 총 tHcy 수준이 100 μmol/L을 초과하는 중증의 고호모시스테인뇨증을 나타내는 반면, 다른 환자는 경증 내지 수회 정상  범위의 상승을 나타낸다(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74), 전체가 참조로 포함됨). tHcy 수준은 질환 중증도와 고도로 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998;21:738-747, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0012] **[0009]** CBSDH는 눈의 병태(수정체전위증 및/또는 심한 근시), 골격계(과도한 키, 긴 팔다리, 척추 측만증, 및 오목 가슴), 혈관계(혈전색전증) 및 중추신경계(CNS)(발달 지연/지적 장애)를 특징으로 한다. 환자에서 이러한 임상 징후가 다양하게 나타나고 있고, 모든 시스템이 관여하거나 적게는 하나만 관여할 수 있다. 일부 환자는 중증의 어린이-발병 다중 시스템 질환이 있는 반면, 덜 심각한 질환을 나타내는 환자는 성인이 되어서도 무증상으로 남을 수 있다. 치료 없이, 보다 중증의 환자에서 기대 수명이 현저히 감소한다(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74, 이의 전문이 참조로 본원에 인용됨).

[0013] **[0010]** 연구에 따르면 CBSDH 환자에서 Hcy 수준의 감소는 임상 증상의 덜 중증 징상과 상관 관계가 있음을 보여준다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998;21:738-747, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). Hcy 수준이 이들 시스템에 손상을 유발하는 경로는 광범위하게 기재되어 있고(문헌참조: 예를 들어, Ajith *et al.* Clin Chim Acta 2015;450:316-321; Sato *et al.* Bone 2005;36:721-726; Behera *et al.* J Cell Physiol 2016,

이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 일반 집단에서 Hcy의 역할을 또한 조사하기 위한 연구를 이끌었다.

[0014] **[0011]** 현재 CBSDH를 관리하기 위한 치료요법이 거의 가용하지 않다. 현재 치료요법은 하기 중 하나 이상의 조합을 통한 황 대사 경로를 표적화한다: 1) 단백질 및/또는 Met 섭취를 줄이기 위한 식이 변형; 2) 다음 중 일부 또는 전부의 보충: 엽산, 비타민 B12, 비타민 B6; 및 3) 축적된 Hcy의 Met로의 효소적 재메틸화를 증진시키기 위한 메틸 공여자 베타인의 보충. CBSDH 환자의 삶의 질(QoL)에 대한 연구는 공개되지 않았지만 환자와 간병인은 고도로 제한되고 사회적으로 고립된 식단을 따르고 관리하는 심리사회적 영향으로 고통받는 것으로 관찰되었으며 장기간의 질환의 의학적 결과에 대해 극도로 불안해한다. 많은 환자들이 장기적 전망을 손상시키지 않으면서 식이 요법을 완화할 수 있는 능력을 갈망한다고 보고한다.

[0015] **[0012]** 따라서, 현재 치료요법보다 환자에 대한 더 큰 효능 및 더 적은 음성 효과 갖는 CBSDH를 치료하는 방법이 당업계에서 오랜 염원이다.

## *발명의 내용*

[0016] **발명의 개요**

[0017] **[0013]** 본원 개시내용의 다양한 구현예는 하기를 포함하는 약물을 제공한다: (a) 서열번호 1을 포함하는 단리된 시스타티오닌 β-신타제 (CBS) 단백질; 및 (b) CBS 단백질에 공유적으로 결합된 PEG 분자. 본원에 기재된 약물의 특정 구현예에서, PEG 분자는 ME-200GS이다.

[0018] **[0014]** 본원 개시내용의 다양한 구현예는 약물 및 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0019] **[0015]** 특정 구현예에서, 제형은 동결건조시킨다. 본원 개시내용의 다양한 구현예는 동결건조된 제형을 제공하고, 재구성시, 상기 재구성된 액체 제형은 인산 완충 식염수 (PBS)에서 약 20 내지 30mg/ml, 또는 약 25mg/ml의 농도; 인산수소이나트륨의 약 11.4mM의 농도; 염화나트륨의 약 137mM의 농도; 염화칼륨의 약 2.70 mM의 농도; 및 인산이수소칼륨의 약 1.98 mM의 농도로 즉석 사용 약물 생성물을 포함한다. 본원에서 즉석 사용 약물 생성물은 치료학적 유효량의 약물 생성물을 포함하는 액체 약제학적 제형, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 페길화된 사람 절단된 CBS 단백질 (예를 들어, 20NHS PEG-CBS)의 약물을 포함하는 유닛 용량의 약제학적 조성물이다. 즉석 사용 약물 생성물은 대상체로의 투여를 용이하게 하기 위한 바이알 또는 유사 컨테이너로 제공될 수 있다.

[0020] **[0016]** 본원 개시내용의 다양한 구현예는 동결건조된 제형을 제공하고, 재구성시, 상기 재구성된 제형은 20 내지 30 mg, 또는 약 25 mg의 약물; 1 mL의 물; 2 mg의 인산수소이나트륨(이수화물); 8 mg의 염화나트륨; 0.2 mg의 염화칼륨; 및 0.3 mg의 인산이수소칼륨을 포함한다. 대안적으로, 동결건조된 제형은 약물, 완충액 및 부형제를 포함하도록 재구성될 수 있다. 특정 구현예에서, 완충액은 15mM의 인산칼륨이다. 특정 구현예에서, 부형제는 8% (w/v)의 트레할로스이다.

[0021] **[0017]** 본원 개시내용의 다양한 구현예는 대상체에서 호모시스틴뇨증을 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0022] **[0018]** 특정 구현예에서, 상기 치료학적 유효량은 약 0.25mg/kg 내지 약 10mg/kg의 범위로부터 선택된 용량이다. 예를 들어, 상기 용량은 약 0.33mg/kg, 약 0.66mg/kg, 약 1.0mg/kg, 또는 약 1.5mg/kg이다. 대안적으로, 상기 용량은 약 2mg/kg, 약 7mg/kg, 및 약 10mg/kg이다. 예를 들어, 상기 용량은 0.5mg/kg일 수 있다. 대안적으로, 치료학적 유효량은 약 5.0mg/kg 내지 약 50mg/kg, 및 약 10.0mg/kg 내지 약 25mg/kg의 범위로부터 선택되는 용량이다. 예를 들어, 상기 용량은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 약 0.25mg/kg, 약 0.33mg/kg, 약 0.66mg/kg, 약 1.00mg/kg, 약 1.50 mg/kg, 약 2.00mg/kg, 약 3.00mg/kg, 약 4.00mg/kg, 약 5.00mg/kg, 약 6.00mg/kg, 약 7.00mg/kg, 약 8.00mg/kg, 약 9.00mg/kg, 약 10.0mg/kg, 약 11.0mg/kg, 약 12.0mg/kg, 약 13.0mg/kg, 약 14.0mg/kg, 약 15.0mg/kg, 약 16.0mg/kg, 약 17.0mg/kg, 약 18.0mg/kg, 약 19.0mg/kg, 약 20.0mg/kg, 약 21.0mg/kg, 약 22.0mg/kg, 약 23.0mg/kg, 약 24.0mg/kg, 약 25.0mg/kg, 약 26.0mg/kg, 약 27.0mg/kg, 약 28.0mg/kg, 약 29.0mg/kg, 약 30.0mg/kg, 약 31.0mg/kg, 약 32.0mg/kg, 약 33.0mg/kg, 약 34.0mg/kg, 약 35.0mg/kg, 약 36.0mg/kg, 약 37.0mg/kg, 약 38.0mg/kg, 약 39.0mg/kg, 약 40.0mg/kg, 약 41.0mg/kg, 약 42.0mg/kg, 약 43.0mg/kg, 약 44.0mg/kg, 약 45.0mg/kg, 약 46.0mg/kg, 약 47.0mg/kg, 약 48.0mg/kg, 약 49.0mg/kg, 및 약 50.0mg/kg.

[0023] [0019] 특정 구현예에서, 상기 방법은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다: 피리독신, 비타민 B6, 및 베타인. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 메티오닌(Met)-제한 식이 중에 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 항-혈소판 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 항-혈소판 제제는 와파린 혈액 희석제 또는 항-응고제이다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 3일마다 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 하루 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 주마다 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6주동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 3개월동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6개월동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6개월 초과동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 대상체의 잔여 수명 동안 반복한다.

[0024] [0020] 본원 개시내용의 다양한 구현예는 대상체에서 호모시스테인(Hcy)의 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] [0021] 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 약 80 μM 미만이다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 10%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 20%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 30%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 40%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 50%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 60%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 70%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 80%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 최대 90%까지 감소된다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 약 10 μM 내지 약 20 μM 범위내에 있다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 10 μM 미만이다. 특정 구현예에서, Hcy의 수준은 투여 단계 후 약 55 μM이다.

[0026] [0022] 특정 구현예에서, 상기 치료학적 유효량은 약 0.25 mg/kg 내지 약 10mg/kg의 범위로부터 선택된 용량이다. 예를 들어, 상기 용량은 약 0.33 mg/kg, 약 0.66 mg/kg, 약 1.0 mg/kg, 약 1.50 mg/kg, 약 2.0 mg/kg, 약 7.0mg/kg, 또는 약 10mg/kg일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 용량은 10mg/kg 미만이다.

[0027] [0023] 특정 구현예에서, 상기 방법은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다: 피리독신, 비타민 B6, 및 베타인. 특정 구현예에서, 상기 대상체는 메티오닌(Met)-제한 식이 중에 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 항-혈소판 제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 항-혈소판 제제는 와파린 혈액 희석제 또는 항-응고제이다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 3일마다 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 하루 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 주마다 약 1회 수행한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6주동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 3개월동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6개월동안 반복한다. 특정 구현예에서, 상기 투여 단계는 약 6개월 초과동안 반복한다. 일부 구현예에서, 상기 투여 단계는 대상체의 잔여 수명 동안 반복한다.

[0028] [0024] 본원 개시내용의 다양한 구현예는 대상체에서 시스테인(Cys)의 수준을 증가시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0029] [0025] 본원 개시내용의 다양한 구현예는 대상체에서 시스타티오닌(Cth)의 수준을 감소시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본원에 기재된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량의 제형을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0030] [0026] 본원 개시내용의 다양한 구현예는 대상체의 안구계, 골격계, 혈관계, 및/또는 중추신경계와 관련된 부정적인 음성의 임상 결과를 치료하거나, 완화시키거나 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본원에에 기재된 약제학적 조성물의 제형의 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

[0031] [0027] 이전의 기재내용 및 기타 목적, 특성 및 이점은, 첨부된 도면에서 도시된 바와 같이, 본원 개시내용의 특정 구현예의 하기의 기재로부터 명백해질 것이다. 도면들은 반드시 일정한 비율로 만들 필요는 없고, 대신에 본원 개시내용의 각종 구현예의 원리를 설명할 때에 강조를된다.

[0028] 도 1은 본원에 기재된 특정 구현예에서 사용된 페길화 공정의 흐름도이다.

[0029] 도 2는 3일 시험 기간 동안 각 시행 동안 퍼즐 박스 시험 참여 조건의 다이어그램이다.

[0030] 도 3은 다양한 식이물(표준 메티오닌 식이물( “STD” ), 높은 메티오닌 식이물( “HMD” ), 및/또는 낮거나 제한된 메티오닌 식이물( “MRD” )의 배경 상에서 20NHS PEG-CBS (도면에서 “PEG CBS C15S로서 언급됨)를 사용한 장기 연속 치료를 사용하는 호모시스틴뇨증의 마우스 모델에서 임상전 연구 결과를 보여준다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0032] I. 서론

[0033] [0031] 시스타티오닌 베타 신타제 결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH) 은 증가된 수준의 혈장 호모시스테인(Hcy)과, 이와 함께 고수준의 Met 및 감소된 농도의 시스테인(Cys)을 특징으로 한다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74; NORD, Kraus JP. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. NORD [serial online] 2017; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 지금까지, CBSDH와 연관된 *CBS* 유전자의 180개 초과의 돌연변이가 동정되었다(문헌참조: Human Genome Mutation Database. 2017. Ref Type: Online Source. Available at hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 호모시스테인(Hcy)은 천연적으로 존재하는 아미노산이고, 이는 세린과 함께 CBS에 대한 기질로서 작용한다. CBS는 트랜스메틸화, 트랜스황화 및 재메틸화 경로의 교차점에서 작동하여 메티오닌(Met)에서 시스테인(Cys)으로의 황의 일방향 흐름을 지배한다(문헌참조: Maclean *et al.* J Biol Chem. 2012;287(38):31994-32005, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 고유 CBS는 알로스테릭 활성화제 S-아데노실메티오닌(SAM)의 결합에 의해 활성화되고 세린이 피리독살-5'-포스페이트(피리독신 또는 비타민 B6) 의존적 방식으로 Hcy와 축합하여 시스타티오닌 (Cth)을 형성하는 β-대체 반응을 촉매한다. CBS의 다운스트림에 작동하는 시스타티오닌 γ-리아제 (CGL)은 기질로서 Cth를 사용하여 Cys를 사용한다. 따라서, CBS의 적당한 기능은 Hcy, Met, 및 Cys의 대사의 조절을 위해 중요하다.

[0034] [0032] CBSDH 징후 및 증상의 중증도 및 발병은 환자들마다 광범위하게 다양하다(문헌참조: Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Trondle *et al.* Acta Med Austriaca 2001; 28:145-151; Kluijtmans *et al.* Am J Hum Genet 1999; 65:59-67; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 많은 환자는 총 호모시스테인(tHcy) 수준이 100 μmol/L을 초과하는 중증의 고호모시스테인뇨증을 나타내는 반면, 다른 환자는 경증 내지 수회 정상 범위의 tHcy 상승을 나타낸다(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74, 이는 이의 전문이 참조로 인용됨). 유의적으로 상승된 tHcy 수준은 일반적으로 보다 중증이 발병과 상관관계가 있고 보다 낮은 수준은 전형적으로 보다 경증 형태의 질환과 상관관계가 있다. 정상의 tHcy 수준은 연령 및 영양 상태와 함께 다양하지만, 전형적으로 10 내지 15 μmol/L 범위이다.

[0035] [0033] CBSDH는 통상적으로 영향받은 개체가 정상의 CBS 기능을 위해 요구되는 CBS 효소 조인자인 피리독신 (비타민 B6)을 사용한 총 호모시스테인 (tHcy)-저하 치료에 응답하는지에 따라 분류된다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31; Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987;26:959-969; 이는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일반적으로 피리독신에 반응하는 환자는 보다 저하된 tHcy 수준을 갖고, 이는 보다 경미한 형태의 장애를 유도한다. 이들 환자들은 나중에 한 가지 또는 몇 가지 CBSDH 증상으로 나타날 수 있으며 많은 환자들이 진단되지 않은 채로 남아 있다. 결과적으로, 피리독신에 고도로 반응하는 환자들은 대부분의 연구에서 적게 나타나는 것으로 사료된다.

[0036] [0034] 후향적 연구에 따르면 가장 높은 thcy 수준(처리 또는 처리되지 않음)을 가진 환자는 삶의 초기에 보다 중증 증상을 나타낸다(문헌참조: Yap et al. J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747; Mudd et al. Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이들 둘다는 이의 전문이 참조로 인용됨). tHcy 수준이 상승된 치료를 받지 않은 개체는 전형적으로 성장 실패, 혈전색전증, 시신경의 탈구를 수반하는 심한 근시, 골다공증 유형의 골절, 마르파노이드 체형(특히 장골의 연장) 및 학습의 어려움을 포함한 정신과적 이상을 나타낸다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; NORD, Kraus JP. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. NORD [serial online] 2017, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다). 상승된 tHcy 수준을 갖는 일부 환자는 중증의 어린이-발병 다중시스템 질환을 갖는다. 처리 없이, 보다 중증의 환자에서 기대 수명이 현저히 감소한다(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis

2017;40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0037] **[0035]** 정상의 사람 혈장은 16mM 미만의 Hcy 유래된 화합물을 함유하고, tHcy로서 측정되고, 유리된-티올 호모시스테인(Hcy-SH 또는 fHcy), 디설파이드(예를 들어, 호모시스테인-시스테인 및 호모시스테인) 및 단백질 결합된 호모시스테인으로 이루어져 있다(문헌참조: Ueland; Nord Med 1989; 104:293-298; Mudd *et al.* N Engl J Med 1995; 333:325; Mudd *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1704-1706; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 설프하이드릴 형태 (호모시스테인; Hcy)와 디설파이드 형태 (호모시스테인) 간의 구분(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)은 많은 병리생리학적 효과가 많은 병리생리학적 효과가 Hcy 내 설프하이드릴 그룹의 존재에 의존하기 때문에 중요하다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Ueland *et al.* Nord Med 1989; 104:293-298; Mudd *et al.* N Engl J Med 1995;333:325; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0038] **[0036]** CBS는 주로 간, 췌장, 콩팥 및 뇌에서 발현된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 촉매 도메인은 피리독살 5'-포스페이트 (피리독신 또는 비타민 B6로서도 공지된 조인자)에 결합하고 조절 도메인은 SAM(알로스테릭 활성화인자)에 결합한다.

[0039] **[0037]** 불충분한 수준의 CBS 효소적 활성은 제1 단계에서 트랜스황화 경로를 차단하여, Hcy 축적, 상승된 SAH 및 Met 수준 및 감소된 Cth 및 Cys 수준을 유도한다. 본원에 검토된 조절이상의 Met 대사물의 임상적 증거가 입증한 바와 같이, 상승된 Hcy (가장 흔히 혈장 tHcy로서 임상적으로 측정된)은 CBSDH의 병리생리학에서 가장 강하게 연루되어 있다.

[0040] **[0038]** 정상 초과의 Hcy 수준은 단백질 상의 설프하이드릴 그룹을 변형시켜 올바른 단백질 가교결합을 예방하고 다중 신체 시스템에 걸쳐 구조적 비정상을 유도한다. 상승된 Hcy 수준은 또한 세포내 신호전달을 손상시켜 내피 기능부전 및, 궁극적으로 혈전색전증 및 혈관 질환을 유도한다. CBSDH에서, Hcy의 축적은 안구, 골격, 혈관 및 심리적 증상을 유발한다.

[0041] **[0039]** CBSDH의 진단은 때로는 CBS 유전자의 분자 유전학적 시험에 의해 확인된다(문헌참조: Sacharow *et al.* Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al, editors. GeneReviewsTM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 현재 스크리닝 근접법은 일반적으로 덜 중증의 CBS 결핍을 갖는 신생아를 검출하지 못하고, 단지 보다 중증의 CBSDH를 소수의 환자를 검출한다(문헌참조: Huemer *et al.* J Inherit Metab Dis. 2015 Nov; 38(6):1007-19; Yap, Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13; Schiff *et al.* Neuropediatrics. 2012 Dec;43(6):295-304).

[0042] **[0040]** 임상 샘플에서 Hcy 수준을 결정하기 위해 선택된 측정은 유리된 Hcy 및 단백질에 결합된 Hcy 또는 디설파이드 형태로 포함한다. 정상의 tHcy 수준은 연령, 성별 및 영양 상태와 함께 다양하지만, 전형적으로 4.5 내지 11 μM의 범위 (QUEST DIAGNOSTICS™ 참조 범위)이다. 많은 CBSDH 환자들은 중증의 과다-호모시스틴뇨증으로 나타나고 총 tHcy 수준은 100 μM 초과이고, 다른 환자들은 경증 내지 수회 정상 범위의 상승을 나타낸다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). tHcy 수준은 고도로 질환의 중증도와 상관관계가 있다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21: 738-47).

[0043] **[0041]** 연구는 CBSDH 환자에서 Hcy 수준의 감소가 임상적 증상의 덜한 중증 현상과 상관관계가 있다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21: 738-47; Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):2080-5; 이 둘다는 본원에 참조로 인용된다). 호모시스테인 수준이 이들 시스템에 대한 손상을 유발하는 경로는 광범위하게 보고되었고(문헌참조: Ajith *et al.* Clin Chim Acta 2015;450:316-321; Behera *et al.* J Cell Physiol 99999:1-6, 2016; Saha *et al.* FASEB J 2016;30:441-456; 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨) 질환에서 Hcy의 유의적 병원성 역할에 노출된 일반 집단에서 Hcy 역할을 조사하는 연구를 유도하였다.

[0044] **[0042]** 본원에 기재된 약물 생성물을 사용한 치료의 한가지 목표는 순환계에서 CBS 효소 활성을 증가시켜 개선된 대사 제어를 유도함으로써 질환의 임상적 증상을 개선시키고 추가의 악화를 서행시키거나 예방하는 것이다. 고분자량의 화합물, 예를 들어, 효소는 제한된 조직 침투 능력을 갖고 따라서 주로 혈장에 존재한다. 이들 단백질은 이들이 여러 기전에 의해 혈류로부터 제거됨으로써 전형적으로 짧은 시기 동안 유지된다(문헌참조:

Vugmeyster *et al.* World J Biol Chem. 2012;3(4):73-92, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 이상적으로, 투여된 CBS는 황 아미노산 대사에 대해 안정한 효과를 갖기에 충분한 시간동안 고활성을 유지한다. 상기 목표는 단백질의 표면 상에 PEG 모이어티의 첨가에 따른 페길화에 의해 성취될 수 있다. 단백질의 페길화는 단백질 안정성 및 크기를 증가시키고 신장 분비를 감소시키면서 광범위하게 받아들여지게 되고 단백질용해, 면역 반응 및 항원성을 최소화하는 전략이다(문헌참조: Kang *et al.* 2009;14(2):363-380, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 본원에 기재된 약물 생성물은 대상체로의 투여를 위해 제형화되고 연장된 전신 노출을 위해 디자인된 페길화된 htCBS C15S 효소이다.

[0045] **A. 호모시스테인뇨증의 임상적 증상**

[0046] **[0043]** CBSDH 환자에서 통상적으로 영향을 받는 4가지 시스템(안구, 골격, 심혈관 및 신경계)에서 상승된 tHcy 수준과 음성 임상적 결과의 인과 효과를 지적하는 유의적인 증거가 있다. 이들 데이터는 약간 상승된 수준의 tHcy와 음성 결과 사이의 강력한 관계를 입증하는 일반 집단에서 연구에 의해 추가로 보충된다.

[0047] **1. 눈**

[0048] **[0044]** 눈에 영향을 미치는 이상은 CBSDH의 초기 임상 징후일 수 있다. 많은 개체는 안구의 중심으로부터 이탈된 눈의 수정체의 이탈 (수정체 전위증)을 나타낸다. 영향을 받는 개체는 또한 일반적으로 심한 근시(짧거나 근거리 시야) 및 홍채광대증(눈의 유색 부분 떨림)을 나타낸다. 수정체전위증 및 근시는 일반적으로 삶의 첫해 후 및 10세 연령 전 비처리된 개체에서 나타난다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 덜 빈번하게 발생하는 다른 눈 이상은 백내장, 시신경 변성 및 녹내장을 포함한다. 일부 개체는 망막 박리를 가질 수 있고, 이로 인해 시야가 흐려지거나 시야에 "부유물(floater)"가 나타날 수 있다(문헌참조: Burke *et al.* Br J Ophthalmol, 1989;73(6): 427-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0049] **[0045]** 상승된 Hcy 수준은 CBSDH를 갖는 환자에서 및 일반 집단에서 안구 합병증, 특히 수정체 탈구에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자이다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31; Ajith *et al.* Clin Chim Acta 2015;450:316-321; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001;5:311-315; 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 처방된 약리학적 및 식이 중재에도 불구하고, 다수의 CBSDH 환자들은 궁극적으로 안구 합병증을 나타낸다. Hcy 수준의 저하는 CBSDH 환자에서 수정체 탈구를 지연시키고 아마도 예방하는 것으로 관찰되었다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21: 738-47, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0050] **2. 중추신경계**

[0051] **[0046]** 정신 지체와 같은 발달 지연 및 학습 문제도 1 내지 3세에 발생하는 CBSDH의 초기 징후일 수 있다(문헌참조: Screening, Technology and Research in Genetics (STAR-G) Project. 2016. Homocystinuria. Available at newbornscreening.info; National Institutes of Health (NIH), US National Library of Medicine, Genetics Home Reference. Homocystinuria. 2016. ghr.nlm.nih.gov; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH가 있는 개체에서 지능 지수(IQ)는 10에서 138 사이인 것으로 보고되었다. 가장 높은 tHcy 수준을 가진 환자는 덜 중증의 영향을 받는 환자(평균 IQ가 79)와 비교하여 보다 낮은 IQ(치료하지 않을 경우 평균 IQ가 57)를 가질 가능성이 더 높다(문헌참조: Sacharow *et al.*, Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mefford HC, et al, editors. GeneReviewsTM [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0052] **[0047]** CBSDH 치료를 받지 않은 개체의 약 20%에서 발작이 발생한다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 많은 개체들은 성격 장애, 불안, 우울증, 강박 행동, 정신병적 에피소드를 포함한 정신과적 문제를 갖고 있다(문헌참조: Sacharow *et al.* 2017). 근긴장 이상과 같은 추체외로 징후도 발생할 수 있다(문헌참조: Screening, Technology and Research in Genetics(STAR-G) Project. 2016. Available at newbornscreening.info Homocystinuria. 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0053] **[0048]** 연구에 따르면 낮은 Met 식이 요법, 엽산/B 비타민 보충 및/또는 피리독신 및 베타인 치료요법으로 유도된 Hcy 수준의 조기 감소가 다양한 신경학적 장애의 진행을 지연시키고 때로는 예방하거나 역전시킬 수 있어 CBSDH를 갖는 환자에서 정의 IQ 발달을 가능하게 한다.(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015;21:89-95; Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001;24:437-447; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 정신 지체, 신경 퇴행성 질환, 발작, 근긴장 이상, 정신병, 인지 장애, 치매 및 우울증을 포함한 상승된 Hcy 수준과 중추 신경계

(CNS) 증상 사이의 연관성은 CBSDH 환자와 일반 인구에서 잘 보고되었다(문헌참조: Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987;26:959-969; Schimke *et al.* JAMA 1965;193:711-719; Herrmann *et al.* Clin Chem Lab Med 2011;49:435-441; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0054] **3. 골격계**

[0055] **[0049]** CBSDH를 갖는 개체는 흔히 다양한 골격 이상이 나타낸다. 영향을 받은 개체는 흔히 긴 뼈의 가늘어지고 늘어나는 것(돌리코스테노멜리아(dolichostenomelia)), 다리가 똑바르면 닿도록 안쪽으로 구부러지는 무릎("무릎 관절" 또는 외반지(genu valgum)), 높은 아치형 발(pes cavus), 척추의 비정상적인 옆쪽 만곡(척추 측만증), 비정상적으로 돌출된 가슴(구흉(pectus carinatum)) 또는 비정상적으로 함몰된 가슴(오목 가슴(pectus excavatum))을 포함하는 "마르파노이드(marfanoid)" 체형을 갖는 흔히 키가 크고 날씬하다. 10대까지, 개체의 50%는 골다공증의 징후를 보여준다(문헌참조: Screening, Technology and Research in Genetics (STAR-G) Project. 2016. Homocystinuria. Available at newbornscreening.info, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH는 부분적으로 낮은 골밀도에 기인할 수 있는 골다공증성 골절의 증가된 위험과 관련이 있다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31; Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016;117:351-354; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0056] **[0050]** 아일랜드 CBSDH 환자 25명에 대한 연구에서 25년 이상 추적한 결과 Hcy-저하 처리에 잘 순응한 환자는 비순응 환자에 비해 골격 이상의 위험이 상당히 낮다는 것을 밝혔다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21: 738-47, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0057] **4. 심혈관계**

[0058] **[0051]** CBSDH와 혈관 질환 사이의 관계는 1985년 동형 접합 CBSDH로 인해 Hcy 수치가 중등도 내지 중증으로 상승한 환자의 전염병학 연구에서 처음으로 입증되었다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 혈전색전증은 대부분 중증의 흔히 생명 위협하는 CBSDH의 합병증이고 임의의 혈관에 영향을 미칠 수 있다. CBSDH 환자의 이환율 및 조기 사망의 주요 원인이다(문헌참조: Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):2080-5, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0059] **[0052]** 혈전색전성 이벤트의 위험은 16세까지 대략 25%이고 29세까지는 50%였다. 여러 보고서는 tHcy 수준을 감소시키는 치료가 CBSDH 환자에서 이환율의 주요 원인인 혈관 질환의 발생률을 어떻게 감소시키는지를 보고하였다(문헌참조: Wilcken *et al.* J Inherit Metab Dis 1997;20:295-300; Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):2080-5, 이의 전문은 본원에 참조로 인용된다). 그때 이후, 다수의 다른 연구는 CBSDH 환자에서 증가된 위험의 혈관 질환, 특히, 정맥 혈전증을 입증하였다(문헌참조: Kelly *et al.* Neurology 2003;60:275-279; Magner *et al.* J Inherit Metab Dis 2011;34:33-37; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0060] **5. 추가의 증상**

[0061] **[0053]** 흔하지는 않지만 CBSDH를 갖는 환자에서 극도로 가늘고 연약한 피부, 부서지기 쉬운 모발, 피부 변색(저색소침착) 및 뺨의 발진(말라 홍조(malar flushing))을 포함하여 몇 가지 추가 발견이 보고되었다. 일부 개체들은 간의 지방 변화, 복벽의 파열(서혜부 탈장) 또는 췌장 염증을 통한 장의 일부 돌출이 발생할 수 있다. 척추의 비정상적인 앞뒤 곡률(후만증)과 붕괴된 폐(자발성 기흉)는 또한 CBSDH가 있는 개체에게서 보고되었다(문헌참조: Yap; Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0062] **[0054]** 요약하기 위해, 단독의 MRD는 혈장 Hcy 농도를 추천된 수준 미만으로 감소시키는데 실패하고 증가된 불안증 및 감소된 골 미네랄화를 유도함에도 불구하고 HCU의 다중 증상을 보정하는데 효과적이다. 한편, 본원에 기재된 바와 같은 20NHS PEG-CBS를 사용한 효소 치료요법은 혈장 Hcy 농도를 100 μM의 제안된 역치 미만으로 감소시켰고 HCU의 모든 모니터링된 증상을 보정하였다. 추가로, 20NHS PEG-CBS는 Met 제한 하에 이의 효능을 보유하여 완전히 정규화된 혈장 생화학적 프로필을 생성한다. 이들 데이터를 사람 환자에게 외삽함에 의해, 본원 발명의 결과는 단일 일상의 긴 치료요법이 HCU의 임상 증상의 예방 및 보정에서 효과적일 수 있기 때문에 20NHS PEG-CBS를 확립한다. 추가로, 20NHS PEG-CBS를 사용한 치료는 Met/식이 제한의 제거를 가능하게 해야만 하고 따라서 이에 따라 HCU 환자 및 이들의 가족의 삶의 질을 실질적으로 개선시켜야만 한다.

[0063] II. 조성물

[0064] **A. 고유 사람 CBS 효소**

[0065] **[0055]** CBS의 완전한 고유 효소는 4개의 동일한 단량체를 갖는 사량체이고, 여기서, 각각의 단량체(63 kDa

크기)는 3개의 기능성 도메인으로 구성된다. 처음에는 헴(heme)에 결합하는 약 70개 아미노산의 N-말단 영역이 있고, 산화환원 감지 및/또는 효소 폴딩에서 기능하는 것으로 사료된다. 두번째는 촉매 코어를 함유하고 Ii형 패밀리 PLP (피리독살-5'-포스페이트)-의존성 효소의 폴드(fold)를 보여주는 중앙 도메인이다. 조효소 PLP는 N-과 C-말단 도메인 사이의 틈에 깊게 묻혀있다. 세번째 영역은 S-아데노실메티오닌 (SAM)에 결합시 효소를 활성화시키는 탠덤 쌍의 CBS 모티프로 이루어진 C-말단 조절 도메인이다. 조절 영역의 제거는 항시성으로 활성인 효소를 생성한다(문헌참조: Miles *et al.* J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):29871-4, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0066] **[0056]** 피리독살-5'-포스페이트(PLP)-의존성 효소 폴드는 헴 그룹을 함유한다. 이것은 PLP-의존성 베타-대체 반응을 촉매하고, 여기서, 이는 L-호모시스테인과 L-세린을 응축시켜 L-시스타티오닌을 형성한다. S-아데노실-L-메티오닌 (Ado-Met)의 C-말단 조절 도메인으로의 결합에 의해 알로스테릭으로 조절되어, 이들 도메인의 형태 재배열 및 자가억제 블록의 방출을 유도한다. CBS 활성화는 또한 총체적으로 C-말단 조절 도메인을 제거하여 항시성으로 활성인 효소의 이량체 형태를 생성시킴에 의해 성취될 수 있다(문헌참조: Miles *et al.* J Biol Chem. 2004 Jul 16;279(29):29871-4; Ereno-Orbea *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 111(37), E3845-3852 (2014); 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0067] **[0057]** 본원에 기재된 약물 생성물에서 활성 물질은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 부가에 의해 변형된, 고유 CBS 단백질을 나타내는, 본원 서열목록 중 서열번호 2 및 WO 2017/083327(이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 의 서열번호 2의 아미노산 서열과 비교하여, 단백질 (htCBS C15S)의 아미노산 위치 15에서 시스테인에서 세린으로의 치환을 갖는 재조합 사람 절단된 CBS 단백질이다. 효소는 또한 htCBS C15S로서 공지되어 있다. 특정 구현예에서, 약물 물질 htCBS C15S은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다.

[0068] **[0058]** 상기 형태의 효소는 사람 CBS (hCBS)의 제조 및 생성에 대한 주요 제약을 부과하는 응집에 대한 높은 경향을 갖는다. 페길화된 htCBS C15S (본원에 정의된 바와 같은 "20NHS PEG-CBS"를 포함하는)는 응집에 덜 민감성인 사량체 보다는 차라리 이량체를 형성하도록 가공되었다. 효소와 같은 고분자량의 화합물은 단백질용해 및 다양한 제거 기전에 의한 분해에 의해 순환계로부터 제거한다(문헌참조: Vugmeyster *et al.* World J Biol Chem. 2012;3(4):73-92, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 페길화는 단백질 안정성을 증가시키고 신장 분비를 감소시키면서 단백질용해 및 면역원성을 최소화하는 것으로 공지되어 있다(문헌참조: Kang *et al.* 2009;14(2):363-380, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이들 구조적 변형은 페길화된 htCBS C15S를 포함하는 본원에 기재된 약물 생성물이 CBSDH에 대한 효소 치료요법 (ET)로서 고유 hCBS 보다는 더 적합한 후보물이 되게 한다.

[0069] **[0059]** 고유 CBS는 세포내 효소이고, 어떠한 기전도 세포외 환경으로부터 효소의 이의 1차 세포내 작용부위로의 효소의 취득을 위해 존재하는 것으로 공지되어 있고, 페길화된 htCBS C15S는 세포외적으로 작용한다. 고유 내인성 CBS와 같지 않게, 페길화된 htCBS C15S는 순환계에서 직접 작용하고 조직에서 간접적으로 작용함에 의해 대사 이상을 보정하고 따라서 활성화를 위해 SAM을 요구하지 않는다. 고유 hCBS 효소는 S-아데노실 메티오닌 (SAM)의 이의 C-말단 조절 도메인으로의 결합시 세포에서 활성화된다. 그러나, 환자 및 건강한 개체 둘다에서 순환계 중 SAM 수준은 CBS 활성화를 위해 요구되는 수준의 훨씬 미만이다(문헌참조: Stabler *et al.* Metabolism, 2002. 51(8): p. 981-8, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 따라서, 고유 CBS의 순환계로의 투여는 CBS가 활성화되지 않음으로 비효과적이다. 페길화된 htCBS C15S는 순환계에서 잔류하고 세포에 진입하지 못하지만 효소가 항시성 활성이 되게하는 CBS C-말단 조절 도메인의 제거에 의해 SAM 활성화를 위한 필요성을 우회하도록 가공되었다.

[0070] **B. 효소 치료요법 (ET)**

[0071] **[0060]** 페길화된 htCBS C15S는 CBSDH의 치료를 위해 Et에 대한 위치 15에서 시스테인의 세린으로의 치환을 갖는 페길화된 절단된 hCBS이다. 상기 변형은 사량체 보다는 이량체를 형성하도록 효소를 최적화하고 항시성으로 활성이다.

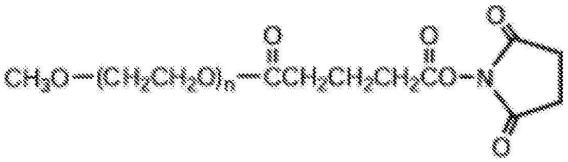
[0072] **[0061]** 페길화된 htCBS C15S는 결핍 CBS 활성을 보충하여 CBSDH를 갖는 환자에서 호모시스테인 (Hcy) 및 메티오닌 (Met)의 혈장, 뇨 및 조직 수준을 감소시키고, 시스타티오닌 (Cth) 수준을 증가시키고 시스테인 (Cys) 수준을 정규화시킨다. 총 Hcy (tHcy) 수준의 감소는 현재 치료 표적이고 (문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨)임상 (안구, 골격, 혈관 및 신경학적) 결과와 강한 상관관계가 있다(문헌참조: Yap; Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0073] **[0062]** 페길화된 htCBS C15S는 이. 콜라이 세균에서 생성되는 고유 사람 CBS 효소의 재조합 형태이다. 고유 사람 CBS의 DNA 서열(본원 서열목록에서 서열번호 3 및 WO 2017/083327(이의 전문은 본원에 참조로 인용됨)의 서열번호 1)은 유전학적으로 변형시켜 C-말단 조절 영역(아미노산 414-551) (본원의 서열목록에서 서열번호 4 및 WO 2017/083327의 서열번호 3)을 제거하여, 사람 절단된 CBS를 형성하였다. 사람 절단된 CBS의 DNA 서열은 추가로 변형시켜 DNA 암호화 영역의 위치 43에서 T→A의 점 돌연변이를 도입하여 해독된 단백질의 위치 15에서 시스테인의 세린으로의 치환을 유도하여 사람 절단된 CBS C15S (htCBS C15S) (본원의 서열 목록에서 서열번호 5 및 WO 2017/083327의 서열번호 13)를 생성한다. 상기 변화는 응집을 감소시키고 고유 hCBS와 비교하여 배치 대 배치 일관성을 가능하게 한다.

[0074] **[0063]** 효소는 추가로 발현 동안에 이. 콜라이에서 추가로 변형시켜 서열번호 1에 나타낸 바와 같이 단백질로부터 첫번째 Met의 제거를 유도한다. 이의 정제 후, htCBS C15S 효소는 단백질의 표면 상에 1차 아민과 반응하는 N-하이드록시숙신이미드 에스테르 기능성화된 20kDa PEG 모이어티를 사용한 페길화에 의해 추가로 변형된다. 5.1 PEG 분자의 대략적인 평균은 290 kDa의 평균 분자량의 이종성 이량체 생성물을 생성하는 효소의 각각의 단량체 유닛에 부착시킨다.

[0075] **C. 20NHS PEG-CBS를 생성하기 위한 htCBS C15S의 페길화**

[0076] **[0064]** ME-200GS (또한 메톡시-PEG-CO$(CH_2)_3$COO-NHS로서 언급된)는 본원에서 htCBS C15S를 페길화시키기 위해 사용된다:

[0077] 

[0078] ME-200GS는 20 kDa의 분자량을 갖고, 화합물명은 α-숙신이미딜옥시글루타릴-ω-메톡시, 폴리옥시에틸렌이다. ME-200GS는 htCBS C15S의 표면 상에 유리된 아민을 표적화한다. 아미드 결합은 htCBS C15S 상에 PEG와 라이신 잔기 사이에 형성된다. 수득한 분자는 본원 개시내용 전반에 걸쳐 "20NHS PEG-CBS"로서 언급되고, 절단되고 서열번호 1에 제공된 바와 같은 C15S 돌연변이를 갖는 페길화된 사람 시스타티오닌 베타-신타제 분자이다.

[0079] **[0065]** 분자량 컷-오프가 100kDa이고 15용적 교환을 갖는 접선 유동 여과(TFF)는 유리된 PEG 및 기타 페길화 불순물을 고갈시키기 위해 사용되고 후속적으로 PBS 완충액에 대한 제형화를 위해 사용된다. 페길화 동안에 PEG로부터 방출된 암모늄 이온 및 기타, 이미다졸, Triton X-100 및 NHS 그룹을 포함하는 모든 공정-관련된 물질은 대형 컷오프 TFF 정용여과 단계의 2 사이클 후 미량의 수준으로 있는 것으로 예측된다.

[0080] **[0066]** PEG ME-200GS는 도 1에 제공된 공정 흐름도에 따라 cGMP 조건하에서 제조원(NOF Corporation)에 의해 제조된다. ME-200GS의 제조에 사용되는 모든 미가공 재료는 합성 또는 무기 특성을 갖는다. PEG ME-200GS 미가공 재료에 잠재적으로 존재할 수 있는 불순물은 소분자이다.

[0081] **D. 해독 후 변형**

[0082] **[0067]** 해독 후 변형은 변형되고 변형되지 않은 폴리펩타이드를 분리하기 위해 추가의 생물공정 단계를 필요로 하여, 생물학적 생성 비용을 증가시키고 생성 효율을 감소시킬 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포에서 폴리펩타이드 제제의 생성은 해독 후 변형에 영향을 미치는 단백질을 암호화하는 표적 유전자의 발현을 조절함에 의해 증진된다. 추가의 구현예에서, 생물학적 생성은 제1 해독 후 변형에 영향을 미치는 단백질을 암호화하는 제1 표적 유전자의 발현을 조절하고 제2 해독 후 변형에 영향을 미치는 단백질을 암호화하는 제2 표적 유전자의 발현을 조절함에 의해 증진된다.

[0083] **[0068]** 추가로, 원핵 세포 또는 진핵 세포에서 발현되는 단백질은 생물학적 생성물의 생성 및/또는 구조, 생물학적 활성, 안정성, 균일성 및/또는 기타 성질을 손상시킬 수 있는 여러 해독 후 변형을 진행할 수 있다. 많은 이들 변형은 세포 성장 및 폴리펩타이드 발현 동안에 자발적으로 일어나고, 펩타이드 골격, 아미노산 측쇄 및 소정의 폴리펩타이드의 아미노 및/또는 카복실 말단에 존재할 수 있다. 추가로, 소정의 폴리펩타이드는 여러 상이한 유형의 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세균 세포, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. Coli)에서*)에서 발현되는 단백질은 아세틸화, 히스톤 클립핑, 카복실화, 및/또는 탈아미드화(문헌참조: Yang *et al.*, PNAS 111 (52) E5633-E5642 (2014), 이의 전문은 본원 참조로 인용됨)에 적용될 수 있다. 예를 들어, 조류 및 포유동물 세포,

예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CH) 세포에서 발현되는 단백질은 아세틸화, 카복실화, 감마-카복실화, 히스톤 클립핑, 탈아미드화, N-말단 글루타민 폐환 및 탈아미드화 및 아스파라긴 탈아미드화에 적용될 수 있다.

[0084] **[0069]** 일부 구현예에서, 단백질 생성은 단백질 탈아미드화에 관여하는 단백질을 암호화하는 표적 유전자의 발현을 조절함에 의해 증진된다. 단백질은 여러 경로를 통해 탈아미드화될 수 있고, N-말단 글루타민의 폐환 및 탈아미드화 및 아스파라긴의 탈아미드화를 포함한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 단백질 탈아미드화에 관여하는 단백질은 N-말단 아스파라긴 아미도하이드롤라제이다. 단백질 탈아미드화는 변경된 구조적 성질, 감소된 효력, 감소된 생물학적 활성, 감소된 효능, 증가된 면역원성, 및/또는 기타 바람직하지 못한 성질을 유도할 수 있고 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, HPLC, 등전점 포커싱, 모세관 전기영동, 고유 겔 전기영동, 역전 상 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 질량 분광측정기 또는 L-이소아스파틸 메틸트랜스퍼라제에 의한 전하를 기반으로 하는 단백질의 분리를 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0085] **[0070]** 일부 구현예에서, 단백질 분비에 영향을 미치는 단백질은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 분자 샤페론이다: Hsp40, HSP47 (또한 서핀 펩티다제 억제제(serpin peptidase inhibitor), 클레이드 H; 열 쇼크 단백질 47), HSP60, Hsp70, HSP90, HSP100, 단백질 디설파이드 이소머라제, 펩티딜 프롤릴 이소머라제, 칼넥신, Erp57 (단백질 디설파이드 이소머라제 패밀리 A, 구성원 3), 및 BAG 1. 일부 구현예에서, 단백질 분비에 영향을 미치는 단백질은 γ-세크레타제, p115, 신호 인지 입자 (SRP) 단백질, 세크레틴 및 키나제(예를 들어, MEK)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0086] **[0071]** 추가의 최적화는 시스템적으로 뉴클레오타이드를 부가하거나 제거하여 보다 길거나 보다 짧은 서열을 생성하고 상기 지점으로부터 표적 RNA를 상향 또는 하향시키는 보다 길거나 짧은 크기의 윈도우를 워킹(walking)함에 의해 생성된 서열을 시험함에 의해 성취될 수 있는 것으로 고려된다. 새로운 후보 표적을 생성시키는 상기 접근법을 당업계에 공지되거나 본원에 기재된 바와 같은 억제 검정에서 상기 표적 서열을 기반으로 하는 RNA 이펙터 분자의 효과를 위한 시험과 커플링시켜 억제 효율에서 추가의 개선을 유도할 수 있다. 추가로 여전히 상기 최적화된 서열은 예를 들어, 본원에 기재되거나 당업계에 공지된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드의 도입, 오버행에서의 부가 또는 변화, 또는 당업계에 공지된 바와 같고/같거나 본원에서 논의된 다른 변형에 의해 발현 억제제로서 분자를 추가로 최적화 (예를 들어, 증가한 막관통 전달 또는 순환계 반감기, 증가한 열 안정성, 증진된 막관통 전달, 특정 위치 또느 세포 유형으로의 표적화, 사일런싱 경로 효소와  증가한 상호작용, 엔도좀으로부터 증가한 방출 등)함에 의해 조정될 수 있다.

[0087] **E. 안정성**

[0088] **[0072]** 약물 또는 약물 생성물은 다양한 온도 및 저장 조건에서 안정하다. 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 -65℃ 및 -20℃에서 저장되는 경우 안정하다. 대안적으로, 약물 또는 약물 생성물은 약 2℃ 내지 약 8℃ 범위의 온도에서 저장되는 경우 안정할 수 있다. 대안적으로, 약물 또는 약물 생성물은 25℃±2℃의 온도에서 저장되는 경우 안정할 수 있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 20℃ 내지 25℃에서 안정한 상태로 남아있다. 특정 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 환원 조건하에서 안정하다. 특정 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 비-환원 조건하에서 안정하다. 일부 구현예에서, 약물 또는 약물  물질은 적어도 2일, 적어도 7일, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월 또는 적어도 12개월 동안 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 2일동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 7일동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 1개월 동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 2개월동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 3개월동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 6개월동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 12개월동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 약 18개월동안의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다.

[0089] **[0073]** 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 최대 18개월 동안 -65℃에서 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 최대 3개월 동안 약 2℃ 내지 약 8℃의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다. 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 최대 1개월 동안 25℃±2℃에서의 저장 동안에 안정한 상태로 남아있다.

[0090] **[0074]** 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 적어도 3회 동결 및 해동 주기 동안 안정한 상태로 남아있다. 일부 구현예에서, 약물 또는 약물 생성물은 최대 6회 동결 및 해동 주기 동안 안정한 상태로 남아있

다. 예를 들어, 약물 또는 약물 생성물은 5회 동결 및 해동 주기 동안 안정한 상태로 남아있다. 특정 구현예에서, 약물 생성물은 주사기로부터 배출 후에 안정하다.

[0091] III. 약제학적 조성물

[0092] **[0075]** 페길화된 htCBS C15S를 포함하는 본원에 기재된 약물 생성물은 CBSDH를 갖는 환자에서 호모시스테인 수준을 감소시키고, 시스테인 수준을 정규화시킴에 의해 대사 제어를 복구시키고 질환의 임상적 증상을 개선시키는 것으로 의도된다. htCBS C15S는 이. 콜라이 BL21 (DE3)을 사용한 재조합 기술에 의해 제조되고, 인산 완충 식염수에서 멸균 약물 생성물로서 제형화된다. 약물 생성물은 피하 (SC) 주사에 의한 투여용으로 의도된다.

[0093] **[0076]** 순환계에서 페길화된 htCBS C15S 활성은 또한 조직에서 대사물 프로필을 개선시키거나 심지어 전반적으로 정규화시켰다(문헌참조: WO 2017/083327, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 따라서, 약물 생성물은 필수적으로 고유 세포내 환경으로 전달될 필요는 없다.

[0094] **[0077]** 약물 생성물은 CBSDH의 환자의 순환계, 뇨 및 조직에서 독성 Hcy의 축적을 감소시키고; 순환계 및 조직에서 Cys 수준을 정규화시키고; 순환계 및 조직에서 Cth의 수준을 증가시키고/시키거나; CBSDH 증상의 발병을 지연시키고/시키거나 역전시킨다. 약물 생성물은 환자가 정상의 식이를 즐길수 있게 해주면서 이들 이득 중 적어도 하나를 성취한다. 사실, 규칙적인 식이(예를 들어, 4.0g/kg의 MET)로도 증가된 Cth 활성은 약물 생성물의 증가된 활성 및/또는 감소된 신장 제거의 입증인 것으로 관찰되었다.

[0095] **[0078]** 20NHS PEG-CBS 약물은 주사용수 (WFI)로 제조된, 인산수소이나트륨(이수화물) (11.4 mM), 염화나트륨 (137 mM), 염화칼륨 (2.7 mM) 및 인산이수소칼륨(1.98 mM)을 함유하는 인산 완충 식염수 (PBS)에서 20-30mg/mL, 또는 약 25mg/mL의 농도로 제형화되었다. 약물은 수용액 중에서 자유롭게 용해되었다.

[0096] **[0079]** SEC/UV/MS의 동위원소 평균 분자량으로부터 계산된 약물 물질의 분자량은 단량체의 경우 45.290kDa이고 이량체의 경우 90.58kDa이다.

[0097] **[0080]** 모든 배치는 실제로 가시적 입자가 없고 색상이 암적색인 투명한 액체였다. 추가로, 환원 및 비-환원 조건 둘다에서 수행된 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 제공된 결과는 각각의 배치에 대해 서로 일치하였다. 페길화 변이체의 특유하고, 균일하고 일정한 패턴은 이들 방법 각각을 사용하여 입증되었다. 항응고제, 비타민 및 미네랄 보충제, 베타인, 항우울제를 포함하는 병용 약물은 또한 약제학적 조성물의 효능을 향상시키기 위해 본원에 기재된 약물 생성물과 조합될 수 있다.

[0098] IV. 제제

[0099] **[0081]** 상기 언급된 치료학적 사용을 위해, 투여된 용량은 사용되는 화합물, 투여 방식, 목적하는 치료 및 지적된 장애에 따라 다양하다. 예를 들어, 본원 개시내용의 화합물의 하루 용량은 흡입되는 경우, 0.05의 체중 킬로그램 당 마이크로그램(μg/kg) 내지 100의 체중 킬로그램 당 마이크로그램(μg/kg)의 범위로 있을 수 있다. 대안적으로 화합물 경구로 투여되는 경우, 본원 개시내용의 화합물의 하루 용량은 0.01의 체중 킬로그램 당 마이크로그램(μg/kg) 내지 100의 체중 킬로그램 당 마이크로그램(mg/kg)의 범위로 있을 수 있다.

[0100] **[0082]** 본원에 기재된 약물을 형성하도록 페길화된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질은 그 자체로 사용될 수 있지만 일반적으로 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체와 연합된 약제학적 조성물의 형태로 투여된다. 따라서, 본원 개시내용는 추가로 약물 및 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체와 연합된 본원에 기재된 약물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0101] **[0083]** 본원의 개시내용의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체는 약제학적 제형의 분야에 통상적으로 사용되는 것들이고, 슈가, 당 알콜, 전분, 이온 교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 렉시틴, 혈청 단백질, 예를 들어, 사람 혈청 알부민, 완충액 물질, 예를 들어, 포스페이트, 글리세린, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세리드 혼합물, 물, 염 또는 전해물, 예를 들어, 프로타민 설페이트, 수소인산이나트륨, 인산 수소 칼륨, 염화나트륨, 아연 염, 콜로이드성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스-기반 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 울지방(라놀린)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0102] **[0084]** 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 경구로, 비경구로, 흡입 분무에 의해, 직장으로, 비강으로, 협측으로, 질내로 또는 이식된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 경구로 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 피하로 투여될 수 있다. 본원의 약제학적 조성물은 임의의 통

상적인 비-독성의 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체를 함유할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 척추강내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0103] **[0085]** 약제학적 조성물은  멸균 주사가능한 제제 형태, 예를 들어, 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액으로서 존재할 수 있다. 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 (예를 들어, Tween 80과 같은) 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 제제는 또한 비독성의 비경구적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체 중에 멸균 주사가능한 용액 또는 현탁액, 예를 들어, 1,3-부탄디올 중에 용액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 보조제, 희석제 및 담체 중에는 만니톨, 물, 링거액 및 등장성 염화나트륨이 있다. 또한, 멸균 고정유도 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 이용된다. 상기 목적을 위해, 임의의 블랜드의 고정유가 사용될 수 있고, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함한다. 지방산, 예를 들어, 올레산 및 이의 글리세리드 유도체는 특히 이들의 폴리옥시에틸화된 버전에서 올리브유 또는 피마자유와 같은 천연 약제학적으로 허용되는 오일로서 주사가능한 제제의 제조에 유용하다. 이들 오일 용액 또는 현탁액은 또한 장쇄 알콜 희석제 또는 분산제를 함유할 수 있다.

[0104] **[0086]** 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 경구적으로 캡슐제, 정제, 산제, 입제 및 수성 현탁액 및 용액을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 경구적으로 허용되는 투여 형태로 투여될 수 있다. 이들 투여 형태는 약제학적 제형의 기술분야에 널리 공지된 기술에 따라 제조된다. 경구용을 위한 정제의 경우에, 통상적으로 사용되는 담체는 락토스 및 옥수수 전분을 포함한다. 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트는 또한 전형적으로 첨가된다. 캡슐 형태의 경구 투여를 위해, 유용한 희석제는 락토스 및 건조된 옥수수 전분을 포함한다. 수성 현탁액이 경구적으로 투여되는 경우, 활성 성분은 유화제 및 현탁제와 조합된다. 경우에 따라, 특정 감미제 및/또는 향제 및/또는 착색제가 첨가될 수 있다.

[0105] **[0087]** 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 직장 투여용 좌제 형태로 제형화될 수 있다. 이들 조성물은 활성 성분을, 실온에서 고체이지만 직장 온도에서는 액체여서 직장에서 용융되어 활성 성분을 방출하는 적합한 비-자극 부형제와 혼합함에 의해 제조될 수 있다. 상기 재료는 코코아 버터, 밀랍 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0106] **[0088]** 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 비강 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 상기 조성물은 약제학적 제형의 기술분야에 널리 공지된 기술에 따라 제조되고, 당업계에 공지된 생체이용률, 플루오로카본 및/또는 기타 가용화제 또는 분산제를 증진시키기 위해 벤질 알콜 또는 다른 적합한 보존제, 흡수 촉진제를 사용한, 식염수 중 용액으로서 제조될 수 있다.

[0107] **[0089]** 본원에서 약제학적 조성물은 순환계를 통해 투여될 형태로 있을 수 있고, 이의 각각의 전문이 본원에 참조로 인용된 WO 2015/153102, WO 2016/183482, 및 WO 2018/009838에 나타낸 바와 같다. CBS 단백질은 적혈구계 또는 혈전양 세포를 포함하는, 핵화된 조혈 세포 (EHC)에 의해 발현된 재조합 핵산에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어, 적혈구계 세포는 적혈구 세포, 적혈구 또는 망상적혈구이다. 예를 들어, 혈전양 세포는 혈소판이다. 특정 구현예에서, 암호화된 CBS 단백질은 해독된 막-부착된 폴리펩타이드에 융합된다. 특정 구현예에서, 상기 CBS 단백질은 EHC의 표면 상에 위치한다. CBS 단백질은 세포외 공간 내 효소의 활성화를 위해 절단될 수 있다. 대안적으로, 내재적으로 국소화된 CBS 단백질은 EHC의 용해에 의해 세포외 공간으로 방출될 수 있다. 대안적으로, CBS 단백질의 효소적 표적은 EHC에 진입하고 이어서 변경 후 막을 통해 배출될 수 있다. 특정 구현예에서, CBS 단백질은 본원 서열 목록에서 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 4 또는 서열번호 5의 아미노산 서열 또는 WO 2017/083327 (이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)의 서열번호 2, 3 또는 13의 아미노산 서열을 갖는다.

[0108] **[0090]** 투여 방식에 의존하여, 약제학적 조성물은 0.05 내지 99 %w (퍼센트 중량), 보다 구체적으로 0.05 내지 80%w, 여전히 보다 구체적으로 0.10 내지 70 %w, 및 보다 더 구체적으로 0.10 내지 50 %w의 활성 성분을 포함하고, 모두는 총 조성물을 기준으로 중량 퍼센트이다.

[0109] **[0091]** 적합한 약제학적 제형의 선택 및 제조를 위한 통상적인 과정은 예를 들어, 문헌(참조: “Pharmaceutics - The Science of Dosage Form Design”, M. E. Aulton, Churchill Livingstone, 1988, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0110] **[0092]** 인산수소이나트륨 (이수화물), 염화나트륨, 염화칼륨, 및 인산이수소칼륨의 완충 용액은 정용여과를 통해 약물에 도입된다.

[0111] **[0093]** 약물 생성물은 PBS (pH = 7.4±0.2)에서 20-30 mg/mL 또는 약 25 mg/mL의 표적 농도로 제형화된다. PBS

완충액은 인산수소이나트륨(이수화물) (11.4 mM), 염화나트륨(137 mM), 염화칼륨 (2.7 mM), 및 인산이수소칼륨 (1.98 mM)을 함유한다. 표 1은 제형의 세부 사항을 제공한다.

[0112] [표 1]

**약물 생성물의 제형**

| 성분 | 배치 당 양 (g) |
|---|---|
| 약물 | 25 mg/mL (범위 20 - 30 mg/mL) |
| 주사용수 (WFI) | 용적에 충분한 양 |
| 인산수소이나트륨 (이수화물) | 11.4 mM |
| 염화나트륨 | 137 mM |
| 염화칼륨 | 2.7 mM |
| 인산이수소칼륨 | 1.98 mM |

[0113]

[0114] **[0094]** 표 2는 본원에 기재된 약물 생성물의 예시적인 유닛 용량 조성물을 제공한다.

[0115] [표 2]

**약물 생성물의 유닛 용량**

| 성분 | 단일 투여 양 (1 mL/바이알) | 기능 |
|---|---|---|
| 약물 | 25 mg | 활성 성분; 효소 |
| 주사용수 (WFI) | 1mL | 용매 |
| 인산수소이나트륨 (이수화물) | 2.0 mg | 완충액 성분 |
| 염화나트륨 | 8.0 mg | 부형제 |
| 염화칼륨 | 0.2 mg | 부형제 |
| 인산이수소칼륨 | 0.3 mg | 완충액 성분 |

[0116] ]

[0117] **[0095]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 대상체에서 약 50mU/μL의 노출을 위해 제형화된다. 동결건조된 제형은 재구성시 사람에게 투여를 위해 사용될 수 있다.

[0118] **A. 동결건조**

[0119] **[0096]** 약제학적 조성물은 동결건조된 제형으로 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 동결건조된 제형은 약물, 완충제 및 부형제를 포함한다. 특정 구현예에서, 적합한 재구성 완충제, 물 또는 임의의 다른 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체 중에서 동결건조된 제형의 재구성시, 약물의 농도는 약 20 내지 30 mg/ml이다. 일부 구현예에서, 약물의 농도는 약 20 mg/ml, 약 21 mg/ml, 약 22 mg/ml, 약 23 mg/ml, 약 24 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 27 mg/ml, 약 28 mg/ml, 약 29 mg/ml, 또는 약 30 mg/ml이다. 일부 구현예에서, 약물의 농도는 약 25.4 mg/ml이다. 특정 구현예에서, 적합한 재구성 완충제, 물 또는 임의의 다른 약제학적으로 허용되는 보조제, 희석제 또는 담체 중에서 동결건조된 제형의 재구성시, 완충제는 15 mM의 농도로 인산칼륨이다. 특정 구현예에서, 부형제는 8% (w/v)의 농도에서 트레할로스이다. 일부 구현예에서, 상기 제형은 슈크로스를 포함하여 적합한 재구성 완충액, 물 또는 약제학적으로 허용되는 부형제, 희석제 또는 담체 중에서 동결건조된 제형의 재구성시 슈크로스의 농도는 5%이다. 일부 구현예에서, 동결 건조 현미경에 의해 결정된 붕괴 개시 온도 (Tc,on)는 -21℃이다. 일부 구현예에서, 상기 제형은 7.5의 pH를 갖는다.

[0120] **[0097]** 일부 구현예에서, 동결건조 공정은 결정 케이크 구조의 용융 없이 48시간 이하에서 수행될 수 있다. 동결건조 공정은 이에 제한되지 않지만 (i) 동결건조된 제형의 감소된 재구성 시간 (예를 들어 1분 미만), (ii) 보다 농축된 약물 생성물을 가능하게 하는 감소된 점도, (iii) 환자에 대한 통증을 최소화하기 위한 등장성 완충액의 혼입, 및/또는 (iv) 감소된 탈-페길화와 같은 파라미터 또는 성질 중 하나 이상을 조정하기 위해 최적화될 수 있다.

[0121] **[0098]** 동결건조된 제형은 하기의 프로토콜을 사용하여 제조될 수 있다. 제형 제조 3일 전에, 20-30 mg/ml 또는 약 25 mg/ml의 약물(-80 ℃에서 저장된)을 냉장고에서 2-8 ℃에서 72시간동안 해동시킨다. 해동 후, 약물은 약한 소용돌이로 균질화시킨다. 투석은 24시간 동안 2-8 ℃에서 제어된 조건하에 수행한다. 20-kDa 컷-오프를 갖는 투석 카세트를 사용하고 완충액은 매번 1:50 이상의 용적 비율에서 3회 교환한다. 완충액은 총 3 내지 6시간

의 투석 시간 후 교환한다. 마지막 투석 단계는 밤새 수행한다. 투석 후, 제형은 투석 카세트로부터 회수하고 0.22-μm 폴리비닐리덴 디플루라이드(PVDF) 필터를 사용함에 의해 여과한다. 여과 후, 바이알은 라미나 기류(Laminar air-flow) 조건하에서 1.0ml의 충전 용적으로 채운다.

[0122] **[0099]** 동결건조는 엡실론 2-12D 스케일 동결 건조기 (제조원: Martin Christ, Osterode, Germany)에서 수행한다. 챔버 압력은 정전용량 게이지(capacitance gauge)에 의해 제어하고, 진공 펌프 및 제어된 질소 투여에 의해 조절된다.

[0123] **[0100]** 바이알의 5℃로의 평형화 후, 바이알은 -45℃로 동결시키고, 추가로 5시간 동안 -45℃에서 평형화하였다. 선반 온도는 1차 건조에서 31시간 동안 -15℃로 설정된다. 2차 건조는 2.5 시간동안 40℃의 선반 온도에서 수행한다. 동결건조 공정의 말기에, 챔버는 질소로 800 mbar로 통기시키고, 바이알은 선반을 들어올려 마개로 막는다. 마개로 막은 후, 챔버는 질소를 사용하여 기압으로 통기시킨다. 표 3은 주기의 최적화 후 동결건조 공정 파라미터를 보여준다.

[0124] [표 3]

**동결건조 공정 파라미터**

[0125]

| # | 단계 | 시간 [hh:mm:ss] | 온도 [℃] | 압력 [mbar] | 총 시간 [h] | 램프 [℃/min] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 부하 | 0:00:00 | 5 | 1,000 | 0.0 | |
| 2 | 5 ℃로 평형화 | 1:00:00 | 5 | 1,000 | 1.0 | |
| 3 | 동결 | 1:40:00 | -45 | 1,000 | 2.7 | 0.50 |
| 4 | 동결 | 5:00:00 | -45 | 1,000 | 6.7 | |
| 5 | 1차 건조 | 0:30:00 | -45 | 0.1 | 7.2 | |
| 6 | 1차 건조 | 1:00:00 | -15 | 0.1 | 8.2 | 0.50 |
| 7 | 1차 건조 | 31:00:00 | -15 | 0.1 | 39.2 | |
| 8 | 2차 건조 | 3:00:00 | 40 | 0.1 | 42.2 | 0.31 |
| 9 | 2차 건조 | 2:30:00 | 40 | 0.1 | 44.7 | |
| 10 | 통기 | 0:30:00 | 40 | 800 | 45.2 | |
| 11 | 마개로 막음 | 0:01:00 | 40 | 800 | 45.2 | |
| 12 | 저장 | 0:30:00 | 5 | 1,000 | 45.7 | |

[0126] **[0101]** 동결 건조 공정동안에, 생성물 온도, 선반 온도, 콘덴서 온도 및 챔버 압력(정전용량 및 피라니(Pirani) 게이지)을 모니터링한다. 생성물 온도는 Pt100 센서 (OMEGATM)에 의해 모니터링한다.

[0127] V. 질환, 장애 또는 병태의 치료

[0128] **[0102]** CBSDH를 갖는 개체들은 전형적으로 태어날때 무증상이고, 이들이 치료받지 않은 경우, 증상은 시간 경과에 따라 이들 개체에서 나타나고, 많은 증상은 어린이에서 나타나고, 이것은 스펙트럼 질환임으로, 일부 환자에서 증상은 단지 성인에서 나타난다(문헌참조: Yap, 2005; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Morris *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Mudd *et al.* In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 4개의 주요 기관계, 전형적으로, 안구, 골격 및 혈관계, 및 CNS가 포함된다. 간, 췌장, 위장관 및 모낭을 포함하는 피부와 같은 다른 기관이 또한 포함될 수 있다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Muacevic-Katanec *et al.* Coll Antropol 2011; 35:181-185; Suri *et al.* J Neurol Sci 2014; 347:305-309, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0129] **[0103]** 축적된 데이터는 Hcy 수준의 감소가 CBSDH에서 효소 치료요법 (ET)의 성공적인 적용을 위한 지표로서 작용할 수 있다. 이것은 "이의 수준이 의학적 생성물로의 노출에 응답하여 변화하는...약리역학적/반응 바이오마커의" 및 심지어 추가로 CBSDH에 대한 ET의 경우에 약물 작용 기전에 밀접하게 결합된 마커의 NIH-FDA 바이오마커 연구 그룹에 의한 정의와 일치한다(문헌참조: FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016-. Reasonably Likely Surrogate Endpoint. 2017 Sep 25. Co-published by National Institutes of Health (US), Bethesda (MD). ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 따라서, 혈액 또는 혈장 Hcy는 약력학적 연구를 위해 유용한 마커일 뿐만 아니라 또한 호모시스틴뇨증 (HCU)에 대한 "합리적으로 유사하게 대용물 평가변수"로서 이전에 인지되었다.

[0130] **[0104]** CBSDH가 있는 유아 및 어린이에서 우선 순위는 CBSDH와 관련된 합병증을 예방하고 정상적인 지능의 적절한 성장과 발달을 보장하는 것이다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문

이 본원에 참조로 인용된다). 이후 삶에서 진단된 환자에서, 치료 목적은 생명 위협 혈전색전증을 예방하고 이미 확립된 합병증의 진행을 최소화하는 것이여야 한다. 이들 목표를 해결하기 위해, CBSDH와 연관된 생화학적 이상이 개선되어야 하고, 가능하다면, 정상화되어야 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0131] **[0105]** CBSDH의 진단 및 관리를 위한 2016년 지침서에 따르면, Hcy 수준은 가능한한 정상에 가깝게 (10 내지 15 μmol/L 이하로) 유지되어야 한다. 이것은 전형적으로 환자에서 CBSDH에 대한 가용한 치료로는 가능하지 않고, 야심적 표적은 피리독신-반응성 CBSDH를 갖는 환자에서 50 μmol/L 미만 및 비-피리독신 반응성 환자에서 100 μmol/L 미만으로 시사된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 앞서 주지된 바와 같이, 비-피리독신 반응성 환자는 피리독신 반응성 환자들 보다 높은 Hcy 수준을 갖는 경향이 있다. 2개의 목표가 동일한 질환을 갖는 환자에 대해 추천되지만, 이들 목표는 합병증을 최소화하기 위해, 최적화된 것보다는 차라리 성취될 수 있는 것으로 디자인되었다.

[0132] **[0106]** 전체적으로, CBSDH를 관리하기 위해 요구되는 장기 치료의 효과는 이들이 가장 흔하게 식이 제한 및 보충에 의존하기 때문에 평생 준수하지 않거나 일관성이 없게 된다. CBSDH에 대한 Et는 많은 이들 함정을 회피한다. 중증의 Met 제한 또는 Cys 보충이 필요하지 않은 기전을 통해 CBSDH의 대사 결함을 보상함으로써 ET는 Met 수준을 위험하게 상승시키지 않으면서 보다 일관된 Hcy 저하를 달성할 것으로 예상되며 또한 식이로부터의 자유화 또는 정상화를 가능하게 한다.

[0133] **[0107]** 현재 병태의 근본적인 유전학적 원인을 보정하는 CBSDH에 대한 치료법이 없지만 일반적으로 허용되는 치료 목표는 tHcy 수준을 가능한 한 많이 감소시키는 것이다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 결과적으로, 현재의 치료요법은 생화학적 이상을 보정함으로써 질환의 불리한 임상적 증상의 위험을 감소시키는 것을 지향한다. Hcy 수준은 CBSDH를 갖는 환자에 대해 현재 가용한 치료로는 좀처럼 완전히 정상화되지 않는다.

[0134] **[0108]** 전략의 조합은 대부분의 환자에서 치료 표적을 성취하기 위해 요구된다. 이들 치료 전략은 다음을 포함한다: 1) 생리학적 용량의 피리독신(비타민 B6, CBS에 대한 조인자, 엽산과 함께)을 피리독신 민감성 환자에게 투여함에 의해 잔여 CBS 활성을 증가시키는 것 (문헌참조: Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):2080-5, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨); 2) 식이물에 대사 차단 초과로 생성물을 보충하면서 심각한 식이/단백질 제한을 통해 메티오닌 부하를 감소시키는 것, 및 3) 대안적 대사 경로를 증진시켜 CBS 결핍의 효과에 대처하는 것, 예를 들어, 베타인 (메틸 공여자)을 투여하여 Hcy의 Met로의 재메틸화를 증진시키는 것. 특정 구현예에서, 폴레이트 보충 및 (필요한 경우) 비타민 B12 보충물이 제공된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0135] **A. CBSDH에 대한 현재 치료요법**

[0136] **[0109]** 일부 구현예에서, CBSDH를 갖는 환자는 적당한 폴레이트 보충물 및 (필요하다면) 비타민 $B_{12}$ 보충물을 받아야 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 추가로, 환자들은 피리독신 치료요법 (반응하는 경우), Met-제한된, Cys-보충된 식이 및/또는 베타인 치료요법으로 치료되어야 한다. 전략의 조합은 대부분의 환자에서 치료 표적을 성취하기 위해 요구된다.

[0137] **[0110]** 대부분의 통상적으로 처방된 치료는 식이 및 베타인의 조합이고 이어서 단독의 베타인 및 단독의 식이이다(문헌참조: Adam *et al.* Mol Genet Metab 2013; 110:454-459, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 환자가 16세 이상이 됨에 따라, 이들은 대부분 흔히 Met-제한된 식이에 대한 성인 환자의 불량한 순응도를 인지하여 식이 없이 단지 베타인을 처방받는다. 그러나, 성인에서 베타인에 대한 순응도는 또한 불량하다. 메디안 단백질 취득은 환자들 중에 광범위하게 다양하고 연령과 함께 급격하게 증가하였다.

[0138] **[0111]** 이들 발견과 일치하여, 최근 보고서는 특이적 CBSDH-적당한 아미노산 보충을 갖는 저단백질 식이를 처방받은 24명의 환자들 중에 단지 4명의 성인 환자가 상기 치료에 따름을 보고하였다(문헌참조: Lorenzini *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Oct 4, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 다수의 CBSDH 전문가는 미국에서 유사하게 광범위 가변성을 보고하였다(미국 CBSDH 전문가인 의사로 구성된 위원회(Orphan Technology Scientific Advice Board)). 치료받지 않은 환자 대 치료받은 환자 (각각 25명 및 93명의 환자들)로부터 tHcy 값을 비교하는 연구는 이들 2개의 그룹 간에 어떠한 유의적인 차이가 없는 것으로 결론지었지만(tHcy는 각각 15.7 내지 281.4 및 4.8 내지 312 μmol/L 범위이고; 메디안 값은 각각 125.0 내지 119.0 μmol/L이다), 상기 연구는 환자의 치료 용법에 대해 어떠한 세부사항을 제공하지 않는다(문헌참조: Stabler *et al.* JIMD Rep 2013; 11:149-

163, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 이들 결과는 하기의 결론 전부 또는 조합을 시사한다: 상기 환자들은 이종성의 질환을 나타내고, 상기 표준 치료는 비효과적이고/이거나, 치료에 대한 순응도는 불량하였다.

[0139] **1. 피리독신**

[0140] **[0112]** 진단 시, 환자들은 CBS의 조인자인 피리독신에 대한 반응에 대해 시험한다. 약리학적 용량에서 피리독신(비타민 B6)의 투여는 피리독신에 반응하는 것으로 나타난 개체에서 CBS의 잔여 활성을 증가시킨다. 피리독신 반응성의 정의는 지역마다 크게 다르지만, 유럽 네트워크 및 호모시스틴뇨증 및 메틸화 결함(EHOD)에 대한 레지스트리의 일부로 작성된 2016년 가이드라인에서는 피리독신 반응성을 피피독신 노출 6주 이내에 thcy 수준의 20% 감소로 정의하였다. tHcy 수준이 심하게 상승된 환자와 tHcy 수준이 약간 또는 적당히 상승한 환자는 둘다 매우 다른 tHcy 수준을 나타냄에도 불구하고 반응성으로 정의될 수 있다. 또한 치료 센터마다 피리독신 반응성을 다르게 정의하므로 피리독신 반응성보다는 tHcy 수준으로 환자를 분류하는 것이 더 적절하고 엄격하다. 일반적으로 피리독신에 반응하는 환자는 일부 잔여 CBS 활성이 남아 있으므로 tHcy 수준이 낮아져 덜 중증의 증상을 나타낸다.

[0141] **[0113]** 피리독신은 일반적으로 CBSDH를 갖는 환자에게 안전한 것으로 간주된다(문헌참조: Yap; Orphanet Encyclopedia [online serial]. 2005, pages 1-13, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 가장 일반적으로 보고된 부작용은 900mg/일 초과로 정의된 고용량으로 치료받은 환자의 말초 신경병증(문헌참조: Schaumburg et al. N Engl J Med 1983;309:445-448; Ludolph et al. Eur J Pediatr 1993; 152:271; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 500mg/일의 피리독신을 투여받은 신생아의 무호흡 및 무반응(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 횡문근융해증(문헌참조: Shoji et al. J Inherit Metab Dis 1998;21:439-440, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)을 포함한다.

[0142] **[0114]** 피리독신 치료가 널리 사용되는 동안, 그것은 tHcy 수준에서 약간의 감소를 제공하고, 반응성으로 정의된 대부분의 환자는 이들의 개시 수준이 정상보다 몇 배나 높기 때문에 피리독신 단독으로는 tHcy 수준을 크게 감소시킬 수 없고 정상화할 수 없다(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 장기간의 피리독신 치료 외에도 피리독신 반응성 환자 CBSDH 환자는 엽산과 필요에 따라 비타민 B12 보충을 받는 것이 권장된다.

[0143] **2. 식이 제한**

[0144] **[0115]** 평생 식이 제한은 이전에 CBSDH를 갖는 모든 환자에 대해 이전에 추천된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; Walter *et al.* Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:S71-6; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 권장 식이는 극히 제한적이며 단백질 함량을 제한하여 Met 섭취를 감소시키는 것을 목적으로 한다.

[0145] **[0116]** CBSDH 환자에 대한 본원의 치료요법의 주류는 Met-부재-L-아미노산이 보충된 하루 당 5g의 적은 천연 단백질을 포함하는 평생 낮은 단백질 식이이고(www.hcunetworkamerica.org), 많은 경우에, 추가의 Cys (문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21: 738-47; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 식이를 보충하기 위해 주어진다. 심하게 제한된 식이는 낮은-메티오닌 시리얼 기반 식품, 낮은-메티오닌 과일 및 야채, 낮은-메티오닌 의료 식품, 오일 및 슈가로 이루어진다. 육류, 닭고기, 생선, 계란, 우유, 요구르트, 치즈, 콩 제품, 견과류, 콩류 및 적당량의 Met가 포함된 많은 과일 및 야채와 같은 식품은 피해야 한다. 고유 CBS는 Met 대사의 핵심 효소이기 때문에 많은 식품에서 발견되는 필수 아미노산인 Met의 섭취는 tHcy의 혈장 농도를 상승시키고 하류 대사물인 Cth 및 Cys의 농도를 감소시킨다.

[0146] **[0117]** 조리 식품, 구운 식품 및 포장 식품에는 이들이 흔히 우유, 계란 또는 밀가루를 함유하고 있기 때문에 고도로 제한되어야 한다. 각 CBSDH 환자가 필요로 하고 견딜 수 있는 단백질의 양은 상이하고 시간에 따라 다양할 수 있다. 상기 양은 빈번한 혈액 시험에서 모니터링된 tHcy 수준에 따라 조정된다(호모시스틴뇨증에 대한 ASIEM 낮은 단백질 핸드북). 식이 치료 중에 있는 대부분의 환자는 또한 2차 영양실조를 예방하고 어린이의 적절한 성장과 적절한 영양을 위한 성인의 적절한 성장을 위해 맛이 좋지 않은 Met-부재 합성 아미노산 조성물을 매일 섭취해야 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0147] **[0118]** 조합된 비타민 보충과 함께 식이 변형이 고도로 제한적인 식이를 완전히 준수하는 개체에서 tHcy 수준을 어느 정도 감소시킬 수 있지만, 대부분의 CBSDH 환자의 tHcy 수준은 정상 초과의 몇배 내지 몇 몇 정도가 높다. 대부분의 개체에 대해, 식이 변형을 평생 준수하는 것은 매우 어려운 일이고, 결과적으로 대사 조절이 잘 되지

않는 기간은 누적된 해로운 효과를 갖는다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 식이 순응도는 종종 불량하며 일반적으로 청소년기와 성인기에 더 악화된다(문헌참조: Walter *et al.* Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:S71-6; Schiff *et al.* Neuropediatrics. 2012 Dec;43(6):295-304; Garland *et al.* Paediatr Child Health. 1999 Nov;4(8):557-62; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 더욱이, 높은 Met 식품을 섭취하는 것은 즉각적인 음성 신체 반응을 일으키지 않아 식이 순응의 어려움을 더욱 악화시킨다.(www.hcunetworkamerica.org). Met 제한은 성장과 발달을 촉진하기 위해 충분한 Met를 보장해야 하기 때문에 어린이에서 보다 더 도전적 과제이다. 식이 치료 중인 대부분의 환자는 어린이에서 적절한 성장과 성인의 적절한 영양 섭취를 위해 Cys가 풍부한 Met-부재 L-아미노산 보충물이 요구된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0148] **[0119]** 최근 보고서는 특이적 CBSDH-적당한 아미노산 보충을 갖는 저단백질 식이를 처방받은 24명의 환자들 중에 단지 4명의 성인 환자가 상기 치료에 따름을 보고하였다(문헌참조: Lorenzini *et al.* J Inherit Metab Dis. 2018 41:109-115, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 다중 CBSDH 전문가는 미국에서 유사하게 광범위 가변성을 보고하였다.

[0149] **3. 베타인 보충**

[0150] **[0120]** 주로 식이에 기초한 치료요법과 연관된 문제로 인해 Hcy를 저하시키기 위한 다른 접근법이 필요했고, 특히 베타인(N,N,N-트리메틸글리신, CYSTADANE™으로 판매됨)이 하루에 적어도 2회 이상 투여되어 보충되어야한다. 베타인은 좀처럼 단독치료요법으로서 효과적이지 않고(문헌참조: Sakamoto *et al.* Pediatr Int 2003;45:333-338, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 정상적으로 피리독신 및/또는 Met-제한 식이에 보조제로 사용된다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0151] **[0121]** 베타인은 기본 CBS 결핍을 해결하지 않고 오히려 대안적 경로를 유도하여 Hcy를 Met로 재메틸화시키고 CBS 돌연변이체의 부분적인 잘못된 폴딩을 보정함에 의해 유도한다(문헌참조: Kopecka *et al.* J Inherit Metab Dis 2011;34:39-48, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 베타인의 존재하에, 효소 베타인 호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(BHMT)는 Hcy를 Met로 재메틸화시키고(문헌참조: Singh *et al.* Genet Med 2004;6:90-95, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 따라서 이미 고도로 상승된 Met 수준을 증가시키면서 Hcy 수준을 부분적으로 감소시킨다. CBS의 다운스트림의 대사물은 베타인 투여에 의해 개선되지 않고, Cys 보충은 필요할 수 있다. 더욱이, 베타인 치료는 급성 대뇌 부종의 존재(문헌참조; Devlin *et al.* J Pediatr 2004,144:545-548; Yaghmai *et al.* Am J Med Genet 2002;108:57-63; 이의 전문 내용이 본원에 참조로 인용됨) 및 부재 (문헌참조: Vatanavicharn *et al.* J Inherit Metab Dis 2008;31 Suppl 3:477-481; Brenton *et al.* J Child Neurol 2014;29:88-92; Sasai *et al.* Tohoku J Exp Med 2015;237:323-327; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)하에 환자에서 뇌의 혈관 손상의 징후(Prins *et al.* Nat Rev Neurol 2015;11:157-165, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)인 대뇌 백질 이상과 관련이 있다.

[0152] **[0122]** 베타인은 맛이 없을 수 있고(문헌참조: Walter et al. Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:S71-6, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 불쾌한 비린내 체취 및/또는 호흡을 유도한다(문헌참조: Manning et al. JIMD Rep 2012;5:71-75, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 효과 둘다는 잠재적으로 고용량(성인 및 소아 환자에서 6g/일 초과)을 위한 필요에 의해 악화된다. 결과적으로, 순응도는 일반적으로 불량하다(문헌참조: Adam *et al.* Mol Genet Metab. 2013 Dec;110(4):454-9; Walter *et al.* Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:S71-6; Sakamoto *et al.* Pediatr Int 2003;45:333-338; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0153] **[0123]** 베타인의 약제학적 제형인 CYSTADANE™은 2006년 FDA에 의해 승인되었고, CBS 결핍, 5,10-메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제(MTHFR) 결핍, 및 코발라민 조인자 대사(cbl) 결함을 포함하는 호모시스틴뇨증 장애에서 상승된 혈액 Hcy를 감소시키는 것으로 나타난다(문헌참조: Recordati. CYSTADANE™ Product Information (PI). 2017. Ref Type: Online Source, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0154] **[0124]** CBSDH 피리독신 무반응 환자 중에서 식이 수행에 대한 현재까지의 최대 조사는 베타인이 특히 늦게 진단된 환자, 청소년 및 성인에서 통상적인 치료 선택임을 지적하였다. 식이 요법 부재하에 환자의 34%에서 1차 요법으로 베타인을 사용하는 것은 식이 요법 없이 제공될 때 베타인의 장기간 효과를 조사한 대조 연구가 없기 때문에 식이 요법 순응 부족으로 인한 것으로 사료된다(문헌참조: Adam *et al.* Mol Genet Metab 2013;110:454-459, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 실제로, CBSDH 마우스 모델에 대한 연구에 따르면 베타인 치료가 tHcy를 현저히 저하시키는 능력이 시간 경과에 따라 감소한 것으로 나타났다(문헌참조: Maclean KN. Betaine

treatment of cystathionine b-synthase-deficient homocystinuria; does it work and can it be improved? Dove press 2012; 2:23-33, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0155] **4. 항-혈소판 치료요법**

[0156] **[0125]** Hcy 저하 치료요법 외에도 Hcy 수준의 조절이 불량한 환자 및/또는 혈전증에 대한 추가 위험 인자(예를 들어, 인자 V Leiden, 이전 혈전증 및 임신)가 있는 환자는 항혈소판제(예를 들어, 아스피린, 디피리다몰 또는 클로피도그렐)(문헌참조: Morris et al. J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)로부터 이득이될 수 있다. COUMADIN™ 혈액 희석제는 또한 이전의 정맥 혈전증을 갖는 환자에서 사용될 수 있다. 그러나, 항응고제는 대뇌 출혈의 증가된 위험과 연관이 있고, 이들의 사용은 개별 환자에 기초하여 결정되어야 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0157] **5. 현재 치료요법을 사용한 임상 결과**

[0158] **[0126]** CBSDH의 증상은 다양한 장애 정도에 도달하고 영향을 받는 개체의 삶의 질에 영향을 미치는 고전적인 임상 증상으로 계속 진행된다. 개체의 발병 연령과 상관 없이, 임의의 연령에서 생화학적 제어 상실은 생명에 위협적일 수 있는 중증의 합병증의 발병과 연관된다(문헌참조: Walter *et al.* Eur J Pediatr. 1998 Apr;157 Suppl 2:S71-6, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0159] **[0127]** 대사 조절이 불량한 기간은 중증의 합병증과 조기 사망으로 이어질 수 있는 유해한 누적 효과를 갖기 때문에 평생 동안 치료를 계속해야한 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0160] **[0128]** 치료 없이, 피리독신-무반응성 CBSDH의 예후는 불량하고 환자의 기대 수명은 현저히 감소된다. 1962년에 질환이 처음 보고된 이후로 CBSDH의 식이 요법 또는 기타 치료요법에 대한 무작위 제어 시험이 수행되지 않았다(문헌참조: Carson *et al.* Arch Dis Child. 1969 Jun;44(235):387-92; Gerritsen *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 1962 Dec 19;9:493-6; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 여러 관찰 연구가 공개되었다.

[0161] **[0129]** 629명의 치료받지 않은 CBS 환자의 자연사를 기록한 국제 연구에 따르면 나이가 들수록 합병증의 위험이 증가함을 보여주었다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 치료(피리독신, Met 제한 식이)는 혈장 tHcy 수준을 저하시키는 것으로 관찰되었고, 혈전색전증 이벤트의 위험 및 수정체 탈구의 위험을 현저히 감소시켰지만 제한 식이 요법의 준수는 불량한 것으로 관찰되었다.

[0162] **[0130]** 얍 등(Yap *et al*)(문헌참조: Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001 Dec;21(12):2080-5)은 158명의 치료받은 환자에서 국제 멀티센터 연구를 수행하였다. 심혈관 이벤트의 발생률은 머드 등(Mudd *et al.*)(문헌참조: Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)으로부터 역사적 대조군 데이터와 비교하는 경우 상기 치료받은 그룹에서 현저히 감소하였다. 상기 명백한 이득은 치료받은 환자에서 보다 저하된 (그러나 정상화되지 않은) tHcy 혈장 수준과 상관관계가 있다. 요구되는 용법의 일관된 준수는 매우 어려운 것으로 주지되었다.

[0163] **[0131]** 전체적으로, 여러 CBSDH 치료 전략이 가용하지만, 이들은 대부분의 환자들을 거의 정상의 tHcy 수준으로 회복시킬 수 없다. 더욱이, 이들의 장기 효과는 평생 동안 준수가 불량하거나 일관되지 않게 한다. 따라서, 일관된 Hcy 저하는 CBSDH 환자에서 유지하기 어렵다. 본원에 기재된 약물 생성물을 사용한 치료는 이들 많은 함정을 회피하는 것을 목적으로 한다. 상당한 Met 제한 또는 Cys 보충이 요구되지 않은 기전을 통해 CBSDH의 대사 결함을 보상함으로써 효소 치료요법 (ET)은 Met 수준을 위험하게 상승시키지 않으면서 보다 일관된 Hcy 저하를 달성할 것으로 예상된다.

[0164] VI. 투약 및 투여

[0165] **[0132]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 피하(SC), 정맥내 (IV) 또는 복막내 (IP) 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, 약물 생성물은 대상체에게 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20회(들)로 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 약물 생성물은 20회 초과로 투여된다. 또 다른 구현예에서, 약물 생성물은 100회 초과로 투여된다. 대안적으로 약물 생성물은 대상체의 나머지 평생 동안 투여될 수 있다.

[0166] **[0133]** 특정 구현예에서, 약물 생성물의 투여는 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18

시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 매일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 주, 2 주, 3 주, 및 개월 마다 반복할 수 있다. 특정 구현예에서, 약물 생성물의 투여는 3일 마다 1회, 2일 마다 1회 또는 하루 1회 수행된다.

[0167] **[0134]** 특정 구현예에서, 약물 생성물의 투여는 몇분, 몇시간, 몇일 또는 몇주 간격인 일련의 투약일 수 있다. 예를 들어, 일련의 투약 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6회일 수 있다. 비제한적인 예로서, 대상체는 24시간 간격으로 3회 용량으로 투여된다. 또 다른 비제한적인 예로서, 대상체는 12시간 간격으로 5회 용량으로 투여된다. 대상체는 사람일 수 있다.

[0168] **[0135]** 특정 구현예에서, 약물 생성물의 투여는 제1의 시리즈 및 제2 시리즈의 용량 사이에 갭을 갖는 일련의 용량의 투여 스케줄에 따를 수 있다. 투약 간의 갭은 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 하루, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 1주, 2주, 3 주, 매월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 12 개월, 13 개월, 14 개월, 15 개월, 16 개월, 17 개월, 또는 18 개월일 수 있다. 일련의 투약 횟수는 2, 3, 4, 5, 또는 6회일 수 있다. 비제한적인 예로서, 대상체는 12시간 간격으로 제1 시리즈의 5회 투약 및 이어서 제1 투약 후 14일에 투여되고, 12 시간 간격으로 제2 시리즈의 5회 투역으로 투여될 수 있다. 또 다른 비제한적 예로서, 대상체에게 8주의 기간에 걸쳐 2개의 시리즈의 용량을 투여하고, 여기서 제1 시리즈는 2주 동안 주 2회 1회 투여이고 제2 시리즈의 투여는 6주 동안 주 3회이다.

[0169] **[0136]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 대상체에게 베타인이 투여된 후 적어도 1회 투여될 수 있다. 베타 투여와 약물 생성물 투여 사이의 시간은 1시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 1일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 1주, 2주, 3 주, 매월, 2 개월, 분기로, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 12 개월, 13 개월, 14 개월, 15 개월, 16 개월, 17 개월, 또는 18 개월일 수 있다. 비제한적인 예로서, 약물 생성물은 대상체에게 베타인을 투여한 후 14일에 투여될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 대상체는 대상체에게 베타인을 투여한 후 2회 용량으로 약물 생성물을 투여받을 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 약물 생성물은 베타인 투여 후 14 또는 15일에 투여될 수 있다.

[0170] **[0137]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 베타인과 조합하여 대상체에게 투여될 수 있다. 조성물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 및 15회 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 약물 생성물은 베타인과 조합하여 15회 초과로 투여될 수 있다. 환자에게 투여될 수 있는 추가의 조합 치료요법은 매우 낮은 단백질/Met 식이 및/또는 비타민/보충물과 같은, 약물 생성물 및 tHcy 수준을 저하시키기 위한 적어도 하나의 치료를 포함한다.

[0171] **[0138]** 하나의 구현예에서, 대상체에게 투여되는 약물 생성물의 용량은 약 0.25mg/kg 내지 약 10mg/kg일 수 있다. 예를 들어, 상기 용량은 약 0.33mg/kg, 약 0.66mg/kg, 1.0mg/kg, 또는 1.5mg/kg 중 하나이다. 대안적으로, 상기 용량은 약 2mg/kg, 약 7mg/kg, 및 약 10mg/kg이다. 예를 들어, 상기 용량은 0.5mg/kg일 수 있다. 대안적으로, 치료학적 유효량은 약 5.0mg/kg 내지 약 50mg/kg, 및 약 10.0mg/kg 내지 약 25mg/kg의 범위로부터 선택되는 용량이다. 예를 들어, 상기 용량은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 약 0.25mg/kg, 약 0.33mg/kg, 약 0.66mg/kg, 약 1.00mg/kg, 약 1.10mg/kg, 약 1.20mg/kg, 약 1.30mg/kg, 약 1.40mg/kg, 약 1.50mg/kg, 약 1.60mg/kg, 약 1.70mg/kg, 약 1.80mg/kg, 약 1.90mg/kg, 약 2.00mg/kg, 약 3.00mg/kg, 약 4.00mg/kg, 약 5.00mg/kg, 약 6.00mg/kg, 약 7.00mg/kg, 약 8.00mg/kg, 약 9.00mg/kg, 약 10.0mg/kg, 약 11.0mg/kg, 약 12.0mg/kg, 약 13.0mg/kg, 약 14.0mg/kg, 약 15.0mg/kg, 약 16.0mg/kg, 약 17.0mg/kg, 약 18.0mg/kg, 약 19.0mg/kg, 약 20.0mg/kg, 약 21.0mg/kg, 약 22.0mg/kg, 약 23.0mg/kg, 약 24.0mg/kg, 약 25.0mg/kg, 약 26.0mg/kg, 약 27.0mg/kg, 약 28.0mg/kg, 약 29.0mg/kg, 약 30.0mg/kg, 약 31.0mg/kg, 약 32.0mg/kg, 약 33.0mg/kg, 약 34.0mg/kg, 약 35.0mg/kg, 약 36.0mg/kg, 약 37.0mg/kg, 약 38.0mg/kg, 약 39.0mg/kg, 약 40.0mg/kg, 약 41.0mg/kg, 약 42.0mg/kg, 약 43.0mg/kg, 약 44.0mg/kg, 약 45.0mg/kg, 약 46.0mg/kg, 약 47.0mg/kg, 약 48.0mg/kg, 약 49.0mg/kg, 및 약 50.0mg/kg.

[0172] **[0139]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 메티오닌-제한된 식이 요법 중에 있는 대상체에게 투여된다. 대안적으로, 약물 생성물은 메티오닌-제한된 식이 요법 중에 있지 않은 대상체에게 투여된다.

[0173] **[0140]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 CBSDH를 치료하기 위한 또 다른 치료제와 동시 투여될 수 있다. 본원에

사용된 바와 같은 "동시 투여"는 2개 이상의 성분의 투여를 의미한다. 동시 투여를 위한 이들 성분은 베타인 또는 비타민 B6을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 동시 투여는 2개 이상의 성분을 동시에 또는 투여 간에 시차, 예를 들어, 1 초, 5 초, 10 초, 15 초, 30 초, 45 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 7 분, 8 분, 9 분, 10 분, 11 분, 12 분, 13 분, 14 분, 15 분, 16 분, 17 분, 18 분, 19 분, 20 분, 21 분, 22 분, 23 분, 24 분, 25 분, 26 분, 27 분, 28 분, 29 분, 30 분, 31 분, 32 분, 33 분, 34 분, 35 분, 36 분, 37 분, 38 분, 39 분, 40 분, 41 분, 42 분, 43 분, 44 분, 45 분, 46 분, 47 분, 48 분, 49 분, 50 분, 51 분, 52 분, 53 분, 54 분, 55 분, 56 분, 57 분, 58 분, 59 분, 1 시간, 1.5 시간, 2 시간, 2.5 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 11 시간, 12 시간, 13 시간, 14 시간, 15 시간, 16 시간, 17 시간, 18 시간, 19 시간, 20 시간, 21 시간, 22 시간, 23 시간, 1 일, 1.5 일, 2 일, 또는 3 일 시차의 투여를 언급한다. 특정 구현예에서, 2개 이상의 성분의 투여 간의 시차는 3일 초과이다.

[0174] **[0141]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 주 당 1회 초기 투여 간격으로 피하 (SC) 주사를 통해 만성적으로 환자에게 투여될 비경구 제제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 주마다 6회 용량에 대한 약물 투여. 특정 구현예에서, 대상체는 18 내지 65세 연령 범위내에 있을 수 있다. 특정 구현예에서, 16세 연령의 젊은 대상체는 유사하게 처리될 수 있다.

[0175] **[0142]** 특정 구현예에서, 투여는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 또는 6 일 과정 동안 수행한다. 특정 구현예에서, 투여는 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 17주, 18주, 19주, 20주, 21주, 22주, 23주, 24주, 25주, 26주, 27주, 28주, 29주, 30주, 31주, 32주, 33주, 34주, 35주, 36주, 37주, 38주, 39주, 40주, 41주, 42주, 43주, 44주, 45주, 46주, 47주 , 48주, 49주, 50주, 51주 또는 52주의 과정 동안 수행한다.

[0176] **[0143]** 특정 구현예에서, 약물 생성물은 피리독신(비타민 B6으로도 지칭됨) 및/또는 항-혈소판 치료요법과의 조합 치료요법으로서 투여된다.

[0177] VII. 환자 분류

[0178] **[0144]** 특정 구현예에서, 본원에 기재된 약물 생성물을 사용한 효과적인 효소 요법을 받을 자격이 있는 개체에는 CBS 유전자의 돌연변이 분석에 의한 유전학적 CBS 결핍 호모시스틴뇨증의 확인 및 80 μM이상의 tHcy의 혈장 수준에 기초하여 CBSDH 진단을 받은 환자가 포함된다.

[0179] **A. 임상적 증상**

[0180] **[0145]** CBSDH의 진단 및 관리에 대한 지침에 따르면, 중증 또는 급속하게 진행되는 근병증, 수정체 탈구 및/또는 발달 지연이 있는 어린이에서 이 질환을 의심해야 한다(문헌참조: Morris *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다). 시험은 또한 혈전색전증 및/또는 수정체 탈구가 있지만 다른 증상이 없는 성인과 안구, 결합 조직, 신경 정신병 및 혈관 합병증을 포함한 다기관 질환이 있는 성인에게도 보장된다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Morris *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Kelly *et al.* Neurology 2003;60:275-279, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0181] **B. 생화학적 분석**

[0182] **[0146]** 혈장 tHcy의 수준은 혈장을 환원제로 처리한 후 모든 유리되고 결합된 호모시스테인 종의 합을 사용하여 결정된다. 안정적인 식이 습관을 가진 건강한 개체에서, tHcy 수준은 시간 경과에 따라 상대적으로 일정하게 유지된다(문헌참조: Refsum *et al.* Clin Chem 2004; 50:3-32; McKinley *et al.* Clin Chem 2001;47:1430-1436; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 단백질이 풍부한 식사를 섭취하면 몇시간의 기간 동안 tHcy 수준이 대략 10% 증가할 수 있다(문헌참조: Verhoef *et al.* Am J Clin Nutr 2005; 82:553-558, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 고호모시스테인혈증(tHcy >40 mmol/L)이 있는 개체를 대상으로 한 연구에서 개체 내 tHcy 수준이 4 내지 8개월 동안 최대 25%까지 다양한 것으로 밝혀졌다. 그러나 식이의 가변성, 분석 방법 및 샘플링 시간에 대한 정보가 제공되지 않아 데이터를 해석하는데 방해가 되었다(문헌참조: Refsum H, Smith AD, Ueland PM *et al.* Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 2004;50:3-32, 이의 전문은 본원에 참조로 인용된다).

[0183] **[0147]** 폴레이트 보충이 없는 집단에서, 상응하는 참조 상한치는 각각 대략 15 및 20 μmol/L이다. 신생아에서 CBS의 진단을 지원하기 위해, 혈장 중 tHcy는 50 내지 100 μmol/L 초과인 것으로 예상되고, 혈장 중 Met는 200

내지 1500 μmol/L (즉, 3 - 23 mg/dL)인 것으로 예상된다(문헌참조: Sacharow *et al.* Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. GeneReviews 2017, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).치료받지 않은 보다 높은 연령의 개체에서 CBS의 진단을 지원하기 위해, 혈장 중 tHcy는 100 μmol/L 초과인 것으로 예상되고, 혈장 중 Met는 50 μmol/L 초과 (즉, 0.7 mg/dL 초과)인 것으로 예상된다. 대조군 신생아 또는 보다 높은 연령의 개체는 혈장에서 15 μmol/L 미만의 tHcy 및 10 내지 40 μmol/L (0.2 - 0.6 mg/dL)의 Met를 갖는 것으로 예상된다.

[0184] **[0148]** 낮은 내지 낮은-정상의 Cth 수준 (각각 참조 범위 0.05 내지 0.08 및 0.35 내지 0.5 μmol/L)과 조합된 높은 내지 높은-정상 Met 수준 (참조 범위는 각각 전형적으로 40 내지 45 및 12 내지 15 μmol/L이다)은 Hcy 재메틸화의 유전학적 및 영양 장애에 의해 유발된 HCU로부터 CBSDH를 구분하기 위해 유용할 수 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Stabler *et al.* JIMD Rep 2013; 11:149-163; Bartl *et al.* Clin Chim Acta 2014; 437:211-217, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 또 다른 유용한 시험은 방사성 또는 중수소 표지 기질을 사용하여 배양된 섬유아세포에서 Hcy 및 세린으로부터 Cth 생산을 결정한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Kraus JP. Methods Enzymol 1987; 143:388-394; Smith *et al.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2012; 911:186-191, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 효소 분석으로 피리독신에 반응하는 개체와 반응하지 않는 개체를 항상 구별할 수 있는 것은 아니며 경증의 경우에는 효소 활성이 정상일 수 있다(문헌참조: Alcaide *et al.* Clin Chim Acta 2015;438:261-265, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 보다 최근에, 장기에서 혈장으로 방출된 CBS의 활성을 측정하는 급속 안정 동위원소 검정은 피리독신 무반응 환자에서 100% 민감성을 보여주었지만 피리독신 응답자에서는 86% 민감성을 나타냈다(문헌참조: Alcaide *et al.* Clin Chim Acta 2015;438:261-265; Krijt *et al.* J Inherit Metab Dis 2011;34:49-55, 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0185] **C. 분자 진단**

[0186] **[0149]** 분자 유전학적 시험 — CBSDH에 대한 골드-표준 진단학적 시험 —은 단일 유전자 시험에 의해 또는 다중 유전자 패널을 사용함에 의해 수행될 수 있다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Sacharow SJ, Picker JD, Levy HL. Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. GeneReviews 2017; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Katsanis *et al.* Nat Rev Genet 2013; 14:415-426; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 특정 CBS 돌연변이를 갖는 고위험의 개체는 표적화된 단일-유전자 시험을 사용하여 스크리닝되어야만 한다. 그러나 이것은 통상의 CBS 돌연변이(예를 들어, 카타르(Qatar)의 CBSDH가 있는 개체의 93%가 p.Arg336Cys; c.1006C>T 돌연변이를 보유함)가 있는 선택된 집단과 알려진 병원성 변이가 있는 가족의 개체에서만 유용하다. 다른 환자에서, CBS 유전자는 서열분석될 수 있고, 병원성 변이가 하나 또는 전혀 발견되지 않는 경우에만 유전자 표적화된 결실/중복 분석을 수행할 수 있다. 대안적으로, 다중 유전자의 동시 분자 시험은 다중 유전자 패널을 사용하여 수행될 수 있다. 사용되는 방법은 서열 분석, 결실/중복 분석 및 다른 비-서열분석-기반 시험을 포함할 수 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다). 일반적으로, 분자 유전학적 시험은 제한된 수의 만연된 돌연변이를 갖는 고위험 집단을 대상으로 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Huemer *et al.* J Inherit Metab Dis 2015;38:1007-101, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0187] **D. 피리독신 반응성 시험**

[0188] **[0150]** 피리독신-반응성 시험은 클리닉에서 사용되어 피리독신 보충이 CBSDH를 갖는 환자에 대해 처방되어야 하는지를 결정한다. 상이한 치료 센터가 피리독신 반응성을 다르게 정의하기 때문에(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 피리독신 반응성에 의한 것 보다는 차라리 tHcy 수준에 의한 환자의 분류가 보다 엄격하다. 피리독신-반응성은 대사 제어의 척도가 아니고 일부 잔여 CBS 활성이 유지되어 있다는 지적이다.

[0189] **E. 신생 스크리닝 (NBS)**

[0190] **[0151]** 일반적으로, CBSDH 결핍에 대한 NBS 시험은 건조된 혈액 반점을 분석하여 Met 수준을 결정함에 의해 수행된다. 대안적으로, NBS에 대한 건조된 혈액 반점에서 Met 보다는 차라리 tHcy 수준의 평가는 전세계 몇개의 센터에서 가용하다. 이것은 높은 Met 수준을 갖는 개체에서 NBS의 가양성률 (false-positive rate)을 감소시키기 위한 제2 역가 시험으로서 사용되고(문헌참조: Turgeon *et al.* Clin Chem 2010;56:1686-1695, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 민감성을 개선시키거나 가음성률(false-negative rate)을 개선시키기 위해 사용되지 않

는다.

[0191] VIII. 표현형 결과

[0192] **[0152]** 후향적 연구는 tHcy 수준과 결과 간의 비례 관계를 보여준다. 최고의 tHcy 수준을 갖는 환자(치료받거나 치료받지 않음)는 생애 초기에 더 심각한 증상을 나타내는 반면, tHcy 수준이 낮은 환자는 증상이 적고 덜 신속하게 진행한다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985;37:1-31, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). tHcy 수준이 상승된 개체는 전형적으로 성장 실패, 혈전색전증, 시신경의 탈구를 수반하는 심한 근시, 골다공증 유형의 골절, 마르파노이드 체형(특히 장골의 연장) 및/또는 학습의 어려움과 같은 정신과적 이상을 나타낸다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; NORD, Kraus JP. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. NORD [serial online] 2017, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다). CBS 결핍의 스펙트럼을 반영하여, 일부 환자는 중증의 어린이 발병 다중 전신 질환을 갖는 반면, 덜 심각하게 상승된 Hcy를 갖는 환자는 성인기로 진단되지 않은 채로 남아 있을 수 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). Hcy 수준이 적당히 상승한 환자라도 다중 음성 결과를 겪지만 Hcy 수준이 심하게 상승한 환자에서는 수명이 현저히 감소된다.

[0193] **[0153]** CBSDH 환자에서 일반적으로 영향을 받는 4가지 시스템(안구, 골격, 심혈관 및 신경계)에서 상승된 tHcy 수준과 음성 임상 결과의 인과 관계를 나타내는 유의적 증거가 관찰되었다. 안구 시스템에서 자주 관찰되는 표현형 결과에는 수정체 외피, 홍채광대증, 근시가 포함되고 덜 자주 관찰되는 표현형 결과에는 녹내장, 시신경 위축, 망막 변성, 망막 박리, 백내장 및 각막 이상이 포함된다. 골격계에서 자주 관찰되는 표현형 결과는 다음을 포함한다: 골다공증, 양오목 척추, 척추측만증, 긴 뼈의 증가된 길이, 불규칙하게 넓어진 골간단, 골간단 침골(metaphyseal spicules), 골단의 비정상적인 크기/모양, 성장 저지선, 편평족(pes cavus) 및 높은 아치형 구개, 그리고 덜 자주 관찰되는 표현형 결과는 다음과 같다: 거미가락증(arachnodactyly), 비대해진 손목뼈, 비정상 골 나이, 새가슴/오목가금(pectus carinatum/excavatum), 외반슬(genu valgum), 척추후만증(kyphosis) 및 단축 4번째 중수골(short fourth metacarpal). 혈관계에서 자주 관찰되는 표현형 결과는 다음을 포함한다: 혈관 폐색, 말라 홍조 및 망상청피반(livedo reticularis). 중추 신경계에서 자주 관찰되는 표현형 결과는 다음을 포함한다: 정신 지체, 정신 장애 및 추체외로 징후, 그리고 덜 자주 관찰되는 표현형 결과는 다음을 포함한다: 발작 및 비정상적인 뇌파. 추가 신체 시스템에서 다음과 같은 표현형 결과가 자주 관찰되며 희고 부서지기 쉬운 모발, 얇은 피부, 간의 지방 변화, 서혜부 탈장, 근병증, 내분비 이상, 응고 인자 감소 및 자발적인 장 천공이 있다.

[0194] **[0154]** 약간 상승된 수준의 tHcy와 음성 결과 사이에 강한 관계가 관찰되었지만 데이터에 따르면 tHcy 수준을 저하시키는 것이 임상 증상에 양성의 영향을 미치는 것으로 나타났다. CBSDH에 대한 문헌은 질환의 희귀성과 후속 소규모 연구로 어려움을 겪지만 심각하게 상승된 Hcy 수준을 갖는 집단에서 임상 결과의 확대로부터 이득을 얻는다. 역으로, 광범위 집단에서의 연구는 대형 샘플 크기이지만 tHcy 수준의 상승이 더 작기 때문에 이득이된다. 종합해보면, 이들 연구는 일관되게 상승된 tHcy 수준이 음성 임상적 결과를 강하게 예측하고 상기 수준을 감소시키기 위한 약리학적 중재가 이로움을 입증한다.

[0195] **[0155]** 본원에 기재된 약물 생성물로 CBSDH를 치료함으로써 얻을 수 있는 잠재적인 결과는 CBSDH 및 기타 필수 아미노산에 대한 다른 치료요법에서 제공되는 것보다 더 높은 농도의 Met를 포함하여 보다 편안한 식이를 유지하면서 혈장 tHcy 농도를 가능한 최저 수준으로 저하시키는 것이다. CBSDH가 있는 유아 및 어린이에서 우선 순위는 CBSDH와 관련된 합병증을 예방하고 정상적인 지능의 적절한 성장과 발달을 보장하는 것이다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017 Jan; 40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이후 삶에서 진단된 환자에서, 우선하는 것은 생명 위협 혈전색전증을 예방하고 이미 확립된 합병증의 진행을 최소화하는 것일 수 있다. 이들 목표를 해결하기 위해, CBSDH와 연관된 생화학적 이상이 개선될 수 있고, 가능하다면, 정상화될 수 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017 Jan; 40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 8개 유럽 국가의 29개 센터에서 CBSDH 환자에 대한 식이 관리 관행을 비교한 조사에 따르면 혈장 tHcy 수준에 대한 표적 범위에 대해 치료 센터에서 거의 일치하지 않는 것으로 나타났고, 메디안 추천된 표적은 55μM 미만이고 29개 센터 중 20 내지 100μM 미만의 범위내에 있다(문헌참조: Adam *et al.* Mol Genet Metab. 2013 Dec;110(4):454-9, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0196] **[0156]** 치료 적격성에 대한 tHcy 수준에 대해 80μM 이상의 컷오프 값은 본원에서 수개월 간격으로 시험된 혈장 tHcy 수준에서 25%의 개인 가변성 내에서 주어진 이전 혈장 tHcy 수준이 100μM인 환자를 배제하는 것으로 회피하도록 선택되어(문헌참조: Refsum *et al.* Clin Chem 2004;50:3-32; Guttormsen *et al.*, J Clin Invest. 1996, 98(9):2174-83; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨) 소수의 환자에서 임상적으로 유의적인 감소를 검출하기에 충분히 높은 수준을 제공한다. 수개월 간격으로 시험된 혈장 tHcy 수준에서 25%의 개인 가변성 내 (문헌참조: Refsum *et al.* Clin Chem 2004;50:3-32; Guttormsen *et al.*, J Clin Invest. 1996, 98(9):2174-83; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 부분적으로 시간 경과에 따라 CBSDH 환자에서 식이, 의약처방 또는 보충에서 변화로 인한 것일 수 있다.

[0197] **[0157]** 치료하지 않으면 피리독신 무반응 CBSDH를 갖는 환자의 예후는 암울하다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 1985년에 629명의 환자에서 CBSDH의 천연 병력을 기록한 국제 후향적 연구에서 치료 전 사건 발생까지의 시간 분석에 의해 환자의 70%가 10세까지 수정체 탈구를 경험했으며 85%는 12세까지 증상이 발병하는 것으로 나타났다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Mudd *et al.*, Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 전반적으로 영향을 받은 개체의 50%는 15세까지 방사선학적으로 척추 골다공증을 가졌고 피리독신 무반응 환자의 23%(반응 환자의 4%)가 30세까지 사망하였다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0198] **[0158]** 종합해 볼 때, 가용한 증거는 제한적인 식이 요법과 식이보충제 사용을 포함한 CBSDH 치료에 대한 현재 접근법이 대부분의 환자에서 질병 진행을 중단하는 데 효과적이지 않음을 지적한다. 결과적으로, CBSDH의 대사 이상을 개선하거나 정상화하고 질환의 임상 징후의 진행을 늦추거나 중단시키는 매우 관용성의 치료법을 동정해야 하는 의학적 요구가 상당히 충족되지 않고 있다.

[0199] **[0159]** 증가된 Hcy 수준과 안구 합병증(특히 수정체 탈구), 골격 결과(특히 골다공증), 혈관 질환(특히, 뇌졸중 및 소혈관 질환) 및 다양한 CNS 결과(특히 인지 기능)를 포함한 CBSDH와 관련된 주요 임상 결과 사이의 인과 효과가 관찰되었다. 상승된 tHcy 수준과 음성 임상 결과 및 반대로 Hcy 수준이 감소하고 임상 결과가 개선됨에 따른 관계가 일반 집단에서 여러 연구에 의해 더욱 강화된다. 전반적으로, 이러한 임상 결과는 Hcy 수준을 가능한 한 정상에 가깝게 감소시키기 위한 조기 CBSDH 진단 및 신속한 치료의 필요성을 강조한다.

[0200] **[0160]** CBSDH 환자의 삶의 질(QoL)에 대한 연구는 공개되지 않았지만 비공개된 보고서는 환자와 간병인이 고도로 제한되고 사회적으로 고립된 식이를 따르고 관리하는 심리사회적 영향으로 고통받고 장기간의 질환의 의학적 결과에 대해 극도로 불안해함을 지적한다. 놀랍지도 않게, 환자들은 장기적 전망을 손상시키지 않으면서 식이 요법을 완화할 수 있는 능력을 갈망한다.

[0201] **[0161]** CBSDH를 갖는 환자에서 tHcy 수준과 주요 임상 결과 사이의 강력한 관계는 tHcy 수준에서의 변화가 CBSDH의 임상 평가변수 조합에 대한 신뢰할 수 있는 대용 마커임을 보여준다. 따라서 tHcy 수준의 변화는 (i) 클리닉에서 환자 진행 상황을 모니터링하고, (ii) 임상 시험에서 새로운 치료법의 임상적 이점을 예측하고, (iii) 치료요법의 효능을 예측하기 위해 유용하다.

[0202] **[0162]** 예를 들어, 약물 생성물은 약물 생성물을 대상체에 투여하기 전과 비교하여 대상체에서 대퇴 동맥 유연성을 정상화하거나 증가시킨다. 예를 들어, I278T 마우스는 야생형 마우스에 비해 상당히 저하된 대퇴 동맥 유연성을 갖는다. Met 제한 식이는 실제로 약물 생성물로 치료한 마우스와 그렇지 않은 마우스 둘다에서 일반 식이에 비해 I278T 마우스에서 보다 작은 대퇴 동맥 직경을 유도할 수 있다.

[0203] **[0163]** 질환의 3개의 뮤린 모델에서 이전에 수행된 연구는 htCBS C15S가 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 WO 2017/083327에 기재된 바와 같이 전신 투여 후 효과적임을 입증하였다. 이들 연구는 뇌와 같은 조직에서 세포외 Hcy 혈장 및 세포내 Hcy 수준에서 최대 90% 감소를 보여주었다. 약물 생성물의 투여는 세포내 공간의 보다 높은 농도에서 약물 생성물이 그것을 추가로 처리할 수 있는 세포외 공간의 더 낮은 농도로 Hcy의 플럭스와 함께 농도 구배를 유도하는 것으로 관찰되었다. 세포외 폐길화된 htCBS C15S는 Hcy "싱크"로서 작용한다. 요약하면, 약물 생성물은 CBSDH의 동물 모델에서 Met 대사 경로의 제어를 복구하였다.

[0204] **[0164]** 이들 연구는 또한 CBSDH의 뮤린 모델에서 폐길화된 htCBS C15S의 SC 투여가 Cth 수준의 상승 및 Cys 수준의 정상화를 포함하는 대사물 수준을 보정하였음을 보여주었다. 또한, 폐길화된 htCBS C15S는 안면 탈모, 간 조직학, 골다공증, 신체 조성, 당뇨병성 망막병증(신장 질환에 이차적일 수 있음), 망막 혈관 폐쇄 또는 비-동

맥염 허혈성 시신경병증, 사이토킨 및 지질 수준으로 인한 황반 및 시신경 위축을 포함하여 마우스에서 질환의 표현형 발현에 양성으로 영향을 미쳤다. 페길화된 htCBS C15S는 또한 조기 사망으로부터 CBS 녹아웃(KO) 마우스를 구제하였다(문헌참조: Looker *et al.* Diabetologia 2003; 46:766-772; Pusparajah *et al.* Front Physiol 2016;7:200; Gerth *et al.* J AAPOS 2008;12:591-596; Stanger *et al.* Clin Chem Lab Med 2005;43:1020-1025; Cahill *et al.* Am J Ophthalmol 2003;136:1136-1150; Minniti *et al.* Eur J Ophthalmol 2014;24:735-743; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 페길화된 htCBS C15S는 또한 질환의 동물 모델에서 만성 투여로 주지된 독성 효과 없이 관용성이 우수한 것으로 관찰되었다.

[0205] **[0165]** 페길화된 htCBS C15S는 세포외 공간에서 작용하며 환자의 유전학, 동시 치료요법 또는 기준선 tHcy 수준에 관계없이 tHcy 혈장 농도를 저하시키는 것으로 예상된다. 따라서, 연구에 대한 적격의 집단은 피리독신 반응성 및 무반응 환자 둘다를 포함해야 한다.

[0206] **[0166]** 건강한 개체에서, tHcy 수준은 대략 5 내지 15μM 범위이고(OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1 ENV/MC/CHEM(98)17 "Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨), 이의 98%는 디설파이드 형태이거나 단백질 결합되어 있다. tHcy의 단지 2%는 효소에 대한 기질로서 작용할 수 있는 비-결합된, 유리된 감소된 아미노티올로서 존재한다(문헌참조: EMA: Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, ev. 1, 21 July 2011; ATL-15-1419 Atlanbio Study Report "LC-MS/MS determination of cystathionine-D4 as product of the cystathionine ß-synthase activity in monkey plasma samples collected during the study 529736"; 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 반면에 CBSDH 환자는 400μM 이상에 도달할 수 있는 혈장 수준을 나타낼 뿐만 아니라 유리된 호모시스테인이 tHcy 값의 10-25%에 도달하는 극적으로 변경된 균형을 나타낸다.

[0207] **[0167]** 마우스 모델에서 페길화된 htCBS C15S를 투여하면 tHcy 수준이 최대 90% 감소하였다. 따라서 효소에 가용한 유리 호모시스테인의 초기 수준(전체의 10%-25%)은 기록된 tHcy 수준의 상당한 감소를 유일하게 설명할 수 없고 추가 풀이 효소에 가용해야만 한다. 예를 들어, PEG htCBS 활성의 결과로 유리된 Hcy가 결여됨에 따라 혈장에서 유리된 Hcy와 Hcy 부가물(단백질 결합 Hcy 또는 디설파이드 형태) 사이의 균형은 효소에 의해 추가로 가공될 수 있는, 유리된 Hcy 생성을 선호하도록 변화한다.

[0208] **A. 안구 합병증**

[0209] **[0168]** 상승된 Hcy 수준은 CBSDH 환자 및 일반 집단에서 안구 합병증, 특히 수정체 탈구에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자이다. 처방된 약리학적 및 식이 중재에도 불구하고, 다수의 CBSDH 환자들은 궁극적으로 안구 합병증을 나타낸다. Hcy 수준을 저하시키는 것은 CBSDH 환자의 수정체 탈구를 지연시키고 아마도 예방하는 것으로 나타났다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Martinez-Gutierrez *et al.* Int Ophthalmol (2011) 31:227-232; Ajith *et al.* Clin Chim Acta 2015; 450:316-321; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315; Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612; Sweetser *et al.* N Engl J Med 2016, 375:1879-1890; Sadiq *et al.* Semin Ophthalmol 2013; 28:313-320; Wright *et al.* Homocysteine, folates, and the eye. Eye (Lond) 2008; 22:989-993; Lieberman *et al.* Am J Ophthalmol 1966, 61:252-255; Harrison *et al.* Ophthalmology 1998, 105:1886-1890; Ramsey *et al.* Am J Ophthalmol 1972; 74:377-385; Couser *et al.* Ophthalmic Genet 2017, 38:91-94; Ghorbanihaghjo *et al.* Mol Vis 2008, 14:1692-1697; Javadzadeh *et al.* Mol Vis 2010; 16:2578-2584; Seddon *et al.* Am J Ophthalmol 2006; 141:201-203; Coral *et al.* Eye (Lond) 2006; 20:203-207; Axer-Siegel *et al.* Am J Ophthalmol 2004, 137:84-89; Heuberger *et al.* Am J Clin Nutr 2002; 76:897-902; Huang *et al.* Sci Rep 2015; 5:10585; Sen *et al.* Indian J Clin Biochem 2008; 23:255-257; Yousefi *et al.* Protein Pept Lett 2013; 20:932-941; Gerth *et al.* J AAPOS 2008; 12:591-596; Stanger *et al.* Clin Chem Lab Med 2005, 43:1020-1025; Cahill *et al.* Am J Ophthalmol 2003, 136:1136-1150; Minniti *et al.* Eur J Ophthalmol 2014, 24:735-743; Turkcu *et al.* Medicina (Kaunas) 2013,49:214-218; Vessani *et al.* Am J Ophthalmol 2003; 136:41-46; Leibovitch *et al.* J Glaucoma 2003, 12:36-39; Leibovitzh *et al.* Medicine (Baltimore) 2016;95:e4858; Micheal *et al.* Mol Vis 2009; 15:2268-2278; Clement *et al.* J Glaucoma 2009; 18:73-78; Cumurcu *et al.* BMC Ophthalmol 2006; 6:6; Bleich *et al.* J Neural Transm (Vienna ) 2002;109:1499-1504; Lee *et al.* Curr Eye Res 2017;1-6; Wang *et al.* Am J Ophthalmol 2004; 137:401-406; Ganapathy *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2009; 50:4460-4470, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 처방된 약리학적 및 식이 중재에도 불구하고

대부분의 CBSDH 환자는 결국 안구 합병증을 나타낸다. Hcy 수준을 저하시키는 것은 CBSDH 환자에서 수정체 탈구를 지연시키고 아마도 예방하는 것으로 나타났다(문헌참조: Yap et al. J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0210] **[0169]** CBSDH의 가장 일관되게 존재하고 가장 초기의 징후 중 하나는 수정체 편위(수정체 탈구)이다(문헌참조: Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이것은 일반적으로 2세 이후에 발생하며, 6세까지 치료받지 않은 피리독신 무반응 환자의 대략 50%, 10세까지 치료받지 않은 피리독신 반응 환자의 50%에서 나타난다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 탈구는 부분적(아탈구) 또는 완전할 수 있으며 하악 또는 비강에서 발생할 수 있지만 일반적으로 둘다에서 일어날 수 있다(문헌참조: Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315; Sweetser *et al.* N Engl J Med 2016;375:1879-1890, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0211] **[0170]** 수정체 탈구는 종종 근시가 급격히 진행되는 기간에 따라 나타나며, 이는 현저한 난시, 단안 복시 및 최적 교정 시력 감소로 이어질 수 있다(문헌참조: Sadiq *et al.* Semin Ophthalmol 2013;28:313-320, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 전반적으로 근시(1디옵터[D] 초과)는 CBSDH 환자의 대략 85%에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 매우 높은 근시(5D 초과)는 환자의 50~76%에 영향을 미친다. 홍채떨림(안구를 움직인 후 홍채의 떨림)은 환자의 대략 56%에 영향을 미치고, 구형수정체 (아탈구되기되기 쉬운 작은 구형 렌즈 )는 환자의 50%에 영향을 미친다(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH와 관련된 추가 합병증에는 백내장 형성, 만성 유리체염(유리체액의 염증) 및 맥락망막 염증, 급성 및/또는 만성 폐쇄각 녹내장을 동반한 동공 차단 및 (어린이의 경우) 약시(약시(lazy eye))를 포함한다(문헌참조: Sadiq *et al.* Semin Ophthalmol 2013;28:313-320, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0212] **[0171]** CBSDH가 있는 24세 미만의 25명의 환자에서 한 장기 후향적 연구의 증거는 어린 나이부터 tHcy 수준이 지속적으로 저하되는 환자에서 수정체 탈구가 예방되거나 적어도 유의적으로 감소 및 지연될 수 있다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998;21:738-747, 이의 전문이 본원에 침조로 인용됨). 초기 Hcy-처하 치료는 또한 근시 악화를 포함한 전반적인 안구 합병증의 위험 감소와 관련이 있다. 지지 증거는 CBSDH를 갖는 32명의 환자 및 25명의 형제 대조군에서 한 사례 대조군 연구로부터 유래하고, 여기서, 초기 Hcy-저하 치료는 일생 후기에 치료를 받았거나 치료에 완전히 준수하지 못한 환자와 비교하여 안구 합병증에서 유의적 감소와 관련이 있다(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015; 21:89-95, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0213] **[0172]** 코발라민 C 결핍증이 있는 25명의 환자를 대상으로 한 지금까지 가장 크고 가장 긴 종단적 연구에서 유사하게 상승된 tHcy 수준을 특징으로 하는 결과에 따르면 황반 변성, 시신경 창백, 안진, 사시 및 혈관 변화가 모두 대부분의 환자에 존재하였다.

[0214] **[0173]** CBSDH 환자에서 및 일반 집단에서 수많은 연구는 근시 및 수정체 탈구(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Martinez-Gutierrez *et al.* Int Ophthalmol 2011; 31:227-232; Suri *et al.* J Neurol Sci 2014; 347:305-309; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315; Lieberman *et al.* Am J Ophthalmol 1966; 61:252-255; Harrison *et al.* Ophthalmology 1998; 105:1886-1890; Ramsey *et al.* Am J Ophthalmol 1972; 74:377-385; Couser *et al.* Ophthalmic Genet 2017;38:91-94; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 홍채떨림(문헌참조: Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨),망막 동맥경화증(문헌참조: Ghorbanihaghjo *et al.* Mol Vis 2008;14:1692-1697, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 노화 관련 황반 변성(문헌참조: Javadzadeh *et al.* Mol Vis 2010; 16:2578-2584; Seddon *et al.* Am J Ophthalmol 2006; 141:201-203; Coral *et al.* Eye (Lond) 2006; 20:203-207; Axer-Siegel *et al.* Am J Ophthalmol 2004;137:84-89, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 노화 관련 황반병증(AMD) (문헌참조: Heuberger *et al.* Am J Clin Nutr 2002; 76:897-902; Huang *et al.* Sci Rep 2015; 5:10585, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 백내장(문헌참조: Sen *et al.* Indian J Clin Biochem 2008; 23:255-257; Yousefi *et al.* Protein Pept Lett 2013; 20:932-941, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 당뇨병성 망막병증 (신장 질환에 이차적일 수 있음) (문헌참조: Looker *et al.* Diabetologia 2003; 46:766-772; Pusparajah *et al.* Front Physiol 2016; 7:200, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 망막 혈관 폐쇄 또는 비동맥염 허혈성 시신경병증(문헌참조: Gerth *et al.* J AAPOS 2008; 12:591-596; Stanger *et al.* Clin Chem Lab Med 2005; 43:1020-1025; Cahill *et al.* Am J Ophthalmol

2003; 136:1136-1150; Minniti *et al.* Eur J Ophthalmol 2014; 24:735-743; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)을 포함하는 다양한 안구 장애와 상승된 Hcy 수준의 관계를 입증하였다(문헌참조: Mudd et al. Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Ajith, Clin Chim Acta 2015; 450:316-321; Mulvihill et al. J AAPOS 2001; 5:311-315; Wright et al. Eye (Lond) 2008;22:989-993, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨).

[0215] **[0174]** CBSDH를 갖는 629명의 환자의 후향적 연구는 일반적으로 2세 이후에 발생하며, 6세까지 치료받지 않은 피리독신 무반응 환자의 대략 50%, 및 10세까지 치료받지 않은 피리독신 반응 환자의 50%에서 나타난다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 코발라민 C 결핍증이 있는 25명의 환자를 대상으로 한 지금까지 가장 크고 가장 긴 종단적 연구에서 유사하게 상승된 tHcy 수준을 특징으로 하는 결과에 따르면 황반 변성, 시신경 창백, 안진, 사시 및 혈관 변화가 모두 대부분의 환자에 존재하였다 (문헌참조: Brooks *et al.* Ophthalmology. 2016 Mar;123(3):571-82, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0216] **[0175]** CBSDH 환자 및 일반 집단 둘다에서 수많은 연구는 근시 및 수정체 탈구(문헌참조: Yap S. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. Orphanet Encyclopaedia [serial online] 2005; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Martinez-Gutierrez *et al.* Int Ophthalmol 2011; 31:227-232; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315; Sadiq *et al.* Semin Ophthalmol 2013; 28:313-320; Lieberman *et al.* Am J Ophthalmol 1966; 61:252-255; Harrison *et al.* Ophthalmology 1998; 105:1886-1890; Ramsey *et al.* Am J Ophthalmol 1972; 74:377-385; Couser *et al.* Ophthalmic Genet 2017;38:91-94, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨), 홍채떨림(문헌참조: Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001;5:311-315, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 망막 동맥경화증(문헌참조: Ghorbanihaghjo *et al.* Mol Vis 2008; 14:1692-1697, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 노화 관련 황반 변성(문헌참조: Javadzadeh *et al.* Mol Vis 2010; 16:2578-2584; Seddon *et al.* Am J Ophthalmol 2006; 141:201-203; Coral *et al.* Eye (Lond) 2006; 20:203-207; Axer-Siegel *et al.* Am J Ophthalmol 2004; 137:84-89; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 노화 관련 황반병증 (AMD) (문헌참조: Heuberger *et al.* Am J Clin Nutr 2002; 76:897-902; Huang *et al.* Sci Rep 2015; 5:10585, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 백내장(문헌참조: Sen *et al.* Indian J Clin Biochem 2008; 23:255-257; Yousefi *et al.* Protein Pept Lett 2013;20:932-941, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 당뇨병성 망막병증 (신장 질환에 이차적일 수 있음) (문헌참조: Looker *et al.* Diabetologia 2003; 46:766-772; Pusparajah *et al.* Front Physiol 2016; 7:200, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 망막 혈관 폐쇄 또는 비동맥염 허혈성 시신경병증(문헌참조: Gerth *et al.* J AAPOS 2008; 12:591-596; Stanger *et al.* Clin Chem Lab Med 2005; 43:1020-1025; Cahill *et al.* Am J Ophthalmol 2003; 136:1136-1150; Minniti *et al.* Eur J Ophthalmol 2014; 24:735-743; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)을 포함하는 다양한 안구 장애와 상승된 Hcy 수준의 관계를 입증하였다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Ajith TA, Ranimenon. Clin Chim Acta 2015; 450:316-321; Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315; Wright *et al.* Eye (Lond) 2008; 22:989-993; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0217] **[0176]** Hcy 수준과 녹내장 사이의 연관성을 조사한 연구는 일관되지 않은 결과를 제공하였다. 일부는 Hcy 수준과 정상 안압 녹내장, 가박리성 녹내장(PEXG) 및 원발성 개방각 녹내장(POAG) 사이에 양성 관계를 보여주었지만 다른 것은 그렇지 않았다(문헌참조: Lieberman *et al.* Am J Ophthalmol 1966;61:252-255; Turkcu *et al.* Medicina (Kaunas ) 2013;49:214-218; Vessani *et al.* Am J Ophthalmol 2003;136:41-46; Leibovitch *et al.* J Glaucoma 2003;12:36-39; Leibovitzh *et al.* Relationship between homocysteine and intraocular pressure in men and women: A population-based study. Medicine (Baltimore) 2016;95:e4858; Micheal *et al.* Mol Vis 2009;15:2268-2278; Clement *et al.* J Glaucoma 2009;18:73-78; Cumurcu *et al.* BMC Ophthalmol 2006;6:6; Bleich *et al.* J Neural Transm (Vienna ) 2002;109:1499-1504; Lee *et al.* Curr Eye Res 2017;1-6; Wang *et al.* Am J Ophthalmol 2004;137:401-406; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 녹내장 개체에서 통상적인 관찰인 망막 신경절 세포(RGC)의 상실은 CBS 유전자 결실에 의해 유발된 내인성 상승된 Hcy 수준을 가진 마우스에서 입증되었으며, 이는 녹내장과 CBSDH 환자의 상승된 tHcy 수준 사이의 연관성이 있음을 시사한다(문헌참조: Ganapathy *et al.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50:4460-4470, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0218] ### 1. 기전

[0219] **[0177]** 높은 Hcy 수준의 안구 건강에 미치는 효과를 설명하기 위해 다수의 기전이 제안되었다(문헌참조: Ajith TA, Ranimenon; Clin Chim Acta 2015;450:316-321, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상승된 tHcy의 효과를

설명하는 기전은 손상된 혈관 내피 기능, 망막 신경절 세포의 아폽토시스, 세포외 매트릭스 변경, 감소된 리실 옥시다제 활성 및 산화 스트레스, 및 수정체 혼탁 및 시신경 손상에 기여하는 나타난 Hcy의 직접적인 세포독성 및 염증 촉진 효과를 포함한다.

[0220] **[0178]** 잠재적인 기전은 또한 N-메틸-D-아스파르테이트(NMDA) 수용체의 활성화를 포함하여 이는 세포 내 칼슘 유입과 활성 산소 종(ROS) 생성을 증가시키고, 이 둘다는 모두 백내장 형성에 기여한다. 이들 변화는 Hcy의 직접적인 세포독성 효과와 함께 내피 손상을 유발할 수 있고, 이는 RGC의 혈전 생성 및 아폽토시스를 개시하여 망막병증 및 녹내장을 유발할 수 있다. 상승된 Hcy 수준은 비대칭 디메틸아르기닌(AMDA) 수준을 증가시키고 산화질소 신타제(NOS) 활성을 차단하여 산화질소(NO) 수준을 감소시켜 혈관 수축 및 시신경 위축을 유발하는 것으로 나타났다. 마지막으로, 혈관벽 상에 호모시스테인화된 단백질의 축적은 항-Hcy 항체 생산 및 염증 반응을 촉발하여 식세포 작용, 산화 스트레스, RGC의 아폽토시스 및 세포외 기질(ECM) 변경을 유발할 수 있다. 함께, 이러한 변화는 혈관계, 수정체 단백질 및 시신경을 손상시켜 궁극적으로 시각 기능장애를 유발한다.

[0221] **[0179]** CBSDH 환자에서 수정체 탈구는 주로 섬유소대, 특히 피브릴린-1과 같은 Cys가 풍부한 다중도메인 ECM 단백질의 퇴행성 변화로 인해 발생하는 것으로 간주된다(문헌참조: Sadiq *et al.* Semin Ophthalmol 2013; 28:313-320; Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2005; 280:34946-34955; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0222] **[0180]** 건강한 개체에서 피브릴린-1 내의 수많은 도메인 내 디설파이드 결합의 형성은 구조적 통합성과 기능에 필수적인 정확한 단백질 폴딩을 가능하게 한다. 이어서, 피브릴린-1 가닥은 가닥 간 디설파이드 결합을 형성하여 미세섬유로 알려진 고분자량 다중단백질 어셈블리를 유도할 수 있다(문헌참조: Kinsey *et al.* J Cell Sci 2008; 121:2696-2704; Hubmacher *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:6548-6553, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0223] **[0181]** 상기 과정은 피브릴린-1과 피브로넥틴 간의 상호작용에 크게 의존한다 (문헌참조: Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 미세섬유는 피부, 폐, 혈관/동맥, 인대 및 눈에서 발견되는 것들과 같은 탄성 섬유 형성의 필수 단계인 트로포엘라스틴 침착을 위한 스캐폴드를 형성한다(문헌참조: Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 피브릴린-1의 중요성은 결합 조직 기능장애가 수정체 탈구, 장기 탈출, 골다공증 및 관절 과운동성과 같은 증상과 관련된 피브릴린-1 유전자에서 돌연변이로 인한 병태인 마르판 증후군을 갖는 환자에 의해 해명된다(문헌참조: Suk *et al.* J Biol Chem 2004; 279:51258-51265; Collod-Beroud *et al.* Hum Mutat 2003; 22:199-208, 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0224] **[0182]** 시험관내 연구에 따르면 피브릴린-1에 Hcy를 추가하면 디설파이드 결합 형성이 붕괴되어 이는 이어서 비정상적인 단백질 폴딩, 단백질용해성 분해에 대한 감수성 증가, ECM 및 탄성 섬유의 비정상적인 형성을 유도한다(문헌참조: Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198; Whiteman *et al.* Antioxid Redox Signal 2006; 8:338-346, 이 둘다는 이들의 전문이 참조로 인용됨). 사람 진피 섬유아세포에 Hcy를 첨가하는 것은 또한 피브릴린-1에 준최적으로 결합하여 미세섬유 형성을 방지하는 감소된 형태의 피브로넥틴과 연관되었다(문헌참조: Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198, 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0225] **[0183]** 수정체 탈구 외에도, CBSDH 환자에서 소대 섬유의 변성은 수정체 곡률 증가, 수정체 근시, 난시, 망막박리, 사시, 백내장 및 홍채떨림을 유발할 수 있다(문헌참조: Sadiq et al. Semin Ophthalmol 2013; 28:313-320, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 치료하지 않는 경우, 수정체의 전방 탈구는 급성 동공 차단 녹내장을 유발할 수 있다. 극단적인 경우, 완전한 수정체 탈구는 안구 축 길이의 증가와 관련이 있으며, 이는 시야 흐림에 대한 보상 반응일 수 있다(문헌참조: Mulvihill *et al.* J AAPOS 2001; 5:311-315, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0226] **[0184]** 1971년에서 1996년 사이에 아일랜드에서 검출된 25건의 CBSDH 사례에 대해 국가 NBS 프로그램 또는 임상 제공에 의해 후향적 연구가 수행되어 임상 결과에 대한 Hcy-저하 치료요법의 효과를 조사하였다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 대다수의 사례 (24/25)는 피리독신 무반응성이었다. 결과적으로, 대부분의 환자에 대한 치료는 필요하다면 비타민 $B_{12}$와 폴레이트 보충제와 함께 Met-부재 Cys 보충 식이 요법으로 이루어졌다. 환자에 대해 생후 6주전에 치료를 개시하였고, 치료를 개시한 상이한 그룹과 치료를 받은 적이 없는 1명의 대조군 환자를 비교하였다. 평균 후속 처리 기간은 생후 6

주전의 치료받은 군에서 14.3년(범위 2.5~23.4년), 기타 환자의 경우 14.7년(범위 11.7~18.8년)으로 총 365.7 환자-년 (patient-years) 치료를 유도한다. NBS에 의해 검출된 21명의 환자들 중에, 18명은 치료 동안에 합병증이 없는 상태로 남아있다. 이들 개체 중 15/18은 20:20 시력을 갖고 3/18은 지난 2년 동안 근시가 증가하였다.

[0227] **[0185]** 머드 등 (Mudd *et al.*)(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)의 발견과 일치하여, 후기 진단된 개체에서 수정체 탈구는 약 2세 연령에 발생하였다. 수정체 탈구는 치료요법과 양호한 순응도 갖는 조기 치료받은 임의의 개체에서 보고되지 않았다. '조기 치료받은 환자들' 중 3명 (최고 수준의 fHcy를 갖는 자들)은 수정체 탈구 없이 악화된 근시를 가졌고, 이는 상기 소그룹의 환자에서 상대적으로 높은 fHcy 수준 때문일 가능성이 높다. 이로 인해 저자들은 환자의 반대 주장에도 불구하고 진행성 근시가 수정체 탈구 이전의 불량한 식이 순응도의 첫 번째 징후일 수 있음을 시사하였다. 이러한 환자의 근시 악화는 이러한 환자에 대한 중성 및 음성 임상 결과 사이의 균형이 얼마나 미약한지를 강조한다. 후기 검출된 환자들은 모두 수정체전위증을 발병하였다. 이것은 치료가 이를 예방하기 보다는 차라리 수정체 탈구의 발병을 지연시킬 수 있음을 시사한다.

[0228] **[0186]** 평생 메디안 혈장 fHcy 수준은 근시가 없는 자들보다 근시를 갖는 환자에서 보다 높았다(각각 18, 18 및 48 μmol/L 대 11 μmol/L). 진단시 치료를 개시한 그룹에서 합병증을 발병한 NBS에 의해 동정된 3명의 환자들 중에서, 모두는 이들의 식이 요법에 비-순응이었다. 전체적으로, 6/24 환자들은 수정체 탈구를 가졌고; 이들 중에서, 2명의 환자들은 조기 진단을 가졌지만 이들의 식이 요법에 비-순응이었고 4명은 후기에 진단되었고, 이는 결코 치료받지 않은 1명의 환자를 포함한다. 머드 등 (Mudd *et al.*)(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)의 발견과 일치하여, 후기 진단된 개체(즉, 2세 후 합병증을 나타내는 환자)에서 수정체 탈구는 대략 2세 연령에 발생하였다. 연구가 공개되었을 때 수정체 탈구는 치료 순응도가 양호한 조기 치료받은 임의의 개체에 의해 보고되지 않았다.

[0229] **[0187]** 순응한 환자는 fHcy 수준을 120 μmol/L보다 훨씬 낮은 tHcy 균등 수준으로 유지하였다. 그러나, 모든 환자는 공개 시점에 24세 미만이었고 많은 환자는 여전히 소아 환자였다. 단백질 제한 식이 요법에 대한 순응도는 청소년기 부터 성인시절까지 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 상기된 섬세한 균형은 이들 환자에 의해 달성된 tHcy 수준의 적당한 감소가 이러한 환자가 나이가 들어감에 따라 증상을 예방하기보다는 증상의 발병을 지연시킬 수 있음을 시사한다.

[0230] **[0188]** 이들 결과(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747; Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 CBSDH의 32개 사례 및 25개 형제자매 대조군에서 시야 방해를 포함하는 결과에 대해 보고하는 카타르에서 수행된 유사 사례-대조군 연구로부터의 것들에 의해 지지되었다(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015; 21:89-95, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 대상체의 평균 연령은 11.2세(0.6 내지 29세 범위)였고 56%는 남성이었다. 전체적으로, 9/32 사례 (28%)는 NBS에 의해 진단되었고 생후 첫번째 달에 치료받았다. 나머지는 생후 14개월에서 240개월 사이에 진단되었다. thcy 및 Met 수준은 임상적으로 진단된 사람들에 비해 NBS를 통해 진단된 자들에서 유의적으로 보다 낮았다. 이것은 능히 생후 초기에 식이 요법 및 의약처방에 대한 보다 양호한 순응도에 기인할 수 있었다. NBS에 의해 동정된 9건의 사례 어떠한 것도 후기 진단 그룹 (그룹 간 $p<0.001$)에서 18건 사례 (78%)와 비교하여 연구 공개 당시 시력 문제를 갖지 않았다. 그러나 상기된 25명의 환자의 아일랜드 연구와 유사하게, 상기 연구에서 환자의 연령은 0.6세에서 29세 범위였으며, 장기간의 합병증은 아직 알 수 없다.

[0231] **[0189]** 머드 등에 의해 작성된 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선과 얍(Yap) 및 노흐텐(Naughten)의 데이터 비교(문헌참조: Yap et al. J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)은 수정체 탈구 및 골다공증에 대해 치료에 순응하는 '조기-치료받은' 환자의 비율이 치료를 받지 않은 CBSDH 환자에서 예상한 것보다 유의적으로 낮았다($p \leq 0.001$).

[0232] **[0190]** 따라서 증가된 Hcy 수준은 CBSDH 환자와 일반 인구에서 안구 합병증, 특히 수정체 탈구에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자로 간주된다(예를들어, 문헌(Yap et al. 및 Mudd et al.)에서 보여지는 바와 같이). 이것은 환자에 의한 치료 순응도 뿐만 아니라 조기 CBSDH 진단 및 치료에 대한 필요성을 강조한다.

[0233] **B. 골격 합병증**

[0234] **[0191]** CBSDH는 부분적으로 낮은 골밀도에 기인할 수 있는 골다공증성 골절의 증가된 위험과 연관이 있다(문헌참조: Mudd *et al.* and Weber et al. Mol Genet Metab 2016;117:351-354; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0235] **[0192]** 8년 동안 19명의 CBSDH 환자로부터의 데이터에 대한 후향적 차트 검토는 낮은 골밀도(BMD)가 소아 및 성인 CBSDH 환자 둘다에게 공통된 것임을 밝혔다(문헌참조: Weber *et al.*). 상기 연구는 골격 성장에 중요한 시기인 아동기 및 청소년기 동안의 골 질량 축적이 CBSDH가 결핍되어 최대 골 질량 달성에 음성 영향을 미칠 수 있음을 시사하였다. 상기 연구는 또한 정상 범위보다 단지 5배 높게 적당히 상승된 tHcy 수준을 가진 식이 요법에 순응한 환자라도 이미 어린 시절에 불량한 골격 임상 결과를 어떻게 겪었는지를 강조하였다.

[0236] **[0193]** 머드 등(Mudd *et al.*)에 따르면, CBSDH를 갖는 환자의 80%는 30세 연령 전에 골다공증을 발병한다. 더욱이, 상승된 Hcy 수준은 CBSDH를 갖지 않은 환자에서라도 골다공증성 골절의 증가된 위험과 연관되어 있다(문헌참조: Sato *et al.* Bone 2005,36:721-726; van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; McLean *et al.* N Engl J Med 2004;350:2042-2049; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0237] **[0194]** 2002년과 2010년 사이에 임상 DXA 골밀도 측정을 수행한 19명의 대상체(3.5세에서 49.2세의 남성 9명)의 데이터에 대한 후향적 차트 검토는 낮은 BMD가 소아 및 성인 CBSDH 환자 둘다에게 공통적이라는 것을 밝혔다(문헌참조: Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016;117:351-354, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 제1 DXA 스캔 시점에, 평균 요추(LS) BMD Z-스코어는 -1.2 ±1.3이었고, 총 고관절 BMD Z-스코어는 -0.89 ±0.4였으며; 둘 다 각각 p=0.002 및 0.02로 0(일반 집단에서 예상된 평균 Z-스코어)보다 유의적으로 낮았다. 진단시 LS BMD Z-스코어는 <21세의 환자에서 1.26 ±1.4였고, 성인에서 1.06 ±1.1이었다. 전반적으로, 환자의 38%는 연령에 비해 낮은 BMD(Z-스코어 ≤-2로 정의됨)를 가졌다. tHcy 및 Met 수준은 다중 선형 회귀 모델에서 LS BMD Z-스코어와 양성으로 연관되어 있다(문헌참조: Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016;117:351-354, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이들 19명의 개체에 대한 평균 tHcy 수준은 단지 59.2 μmol/L이었고, 19명 환자의 대다수는 소아이다. 상기 연구는 골격 성장에 중요한 시기인 아동기 및 청소년기 동안의 골 질량 축적이 CBSDH가 결핍되어 최대 골 질량 달성에 음성 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 상기 연구는 또한 정상 범위보다 단지 5배 높게 적당히 상승된 tHcy 수준을 가진 식이 요법에 순응한 환자가 이미 어린 시절에 불량한 골격 임상 결과를 어떻게 겪었는지를 강조한다.

[0238] **[0195]** 이전 연구에서는 Hcy 수준과 노인 집단의 골절 위험 간에 명확한 관계를 입증하였다(문헌참조: Sato *et al.* Bone 2005,36:721-726; van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; McLean *et al.* N Engl J Med 2004;350:2042-2049; 이의 각각의 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). ≥ 55세의 2,406명의 대상체를 포함한 2건의 전향적 인구 기반 연구 결과는 연령 및 성별에 따른 골절 위험이 tHcy 수준에서 각각의 하나의 SD 증가에 대해 30%씩 증가하였다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 가장 높은 연령별 사분위수에서 호모시스테인 수준은 골절 위험이 1.9배 증가하는 것과 관련이 있었다. 호모시스테인 수준과 골절 위험 사이의 연관성은 골밀도 및 기타 골절의 잠재적 위험 요소와 무관한 것으로 나타났다. 증가된 호모시스테인 수준은 일반 집단에서 노인 남성과 여성의 골다공증성 골절에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자였으며, 그 규모는 골절 및 심혈관 질환에 대한 확립된 위험 인자와 유사하였다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 추가로, 825명의 남성과 1,174명의 여성을 대상으로 한 미국 전향적 연구(HOPE-2 시험 하위 연구)는 최고 사분위수의 혈청 tHcy 수준이 가장 낮은 사분위수의 혈청 thcy 수준과 비교하여 고관절 골절 위험을 여성에서는 1.9배 및 남성에서는 4배 증가시키는 것과 연관이 있음을 밝혔다(문헌참조: Sawka *et al.* Arch Intern Med. 2007 Oct 22;167(19):2136-9, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). tHcy 수준과 골절 위험 사이의 연관성은 BMD 및 기타 골절 위험 요소와 무관하였다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; McLean *et al.* N Engl J Med 2004,350:2042-2049; Sawka *et al.* Arch Intern Med. 2007 Oct 22;167(19):2136-9; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0239] **[0196]** 이러한 결과와 일치하게, 65세 초과의 뇌졸중 환자 433명을 대상으로 한 연구는 1000명의 사람-년당 연령에 따른 고관절 골절 발생률이 Hcy 수준의 가장 낮은 사분위수에서 2.89에서 가장 높은 사분위수에서 27.87로 거의 선형으로 증가됨을 밝혔다(문헌참조: Sato *et al.* Bone 2005; 36:721-726, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 함께, 이들 결과는 증가된 Hcy 수준이 노인 남성 및 여성에서 골다공증성 골절에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자임을 시사한다.

[0240] **[0197]** 골격 이상은 태어날 때 나타나지 않으며 유아와 아주 어린 소아에서는 흔하지 않다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985;37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 골격 관여의 제1 징후는 일반적으로 외반신과 요골이며, 장골의 신장(마르판 증후군의 전형적인 특징)은 종종 사춘기에 이르러 발병한다.(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 특히 척추와 장골의

골다공증은 CBSDH 환자에서 흔하며 척추 측만증/후만증 및/또는 척추 붕괴를 유발할 수 있다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985;37:1-31; Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016;117:351-354; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 다른 골격 징후는 돌출된 윗니와 높은 입천장 및 전흉벽 기형, 예를 들어, 오목가슴 또는 융기부에 의해 유발된 마르파노이드 얼굴 특성을 포함할 수 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017;40:49-74; Sweetser *et al.* N Engl J Med 2016;375:1879-1890; Brenton *et al.* J Bone Joint Surg Br 1972;54:277-298; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 마르판(Marfan) 증후군과 CBSDH 사이의 이들 공유된 골격 특징 때문에, CBSDH 환자는 때때로 마르판 환자로 잘못 분류되어 있다.

[0241] **[0198]** 아일랜드 CBSDH 환자 25명을 대상으로 25년 동안 추적한 연구는 골다공증 위험이 비-순응 환자 또는 후기 진단을 갖는 환자들과 비교하여 양호한 Hcy-저하 치료 순응도와 함께 신생아 스크리닝을 통해 동정된 환자에서 상당히 낮았다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998;21:738-747). 이러한 결과를 뒷받침하는 증거는 장기간의 대사 조절이 양호한 5명의 CBSDH 환자에서 소규모 한국 연구에서 나왔다. 상기 연구에서 조기 Hcy 저하 치료요법을 받은 환자는 이후 진단을 받은 환자보다 골격 이상이 적었다(문헌참조: Lim *et al.* Osteoporos Int 2013,24:2535-2538, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 최종적으로 CBSDH에 대한 뮤린 모델을 사용한 연구에서 CBS ET 치료에 의한 tHcy 수준의 정상화는 골다공증 예방과 관련이 있다(문헌참조: Majtan *et al.* Enzyme replacement prevents neonatal death, liver damage, and osteoporosis in murine homocystinuria, FASEB J 2017, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0242] **[0199]** CBSDH 환자에서 낮은 BMD 및 골격 취약성을 초래하는 정확한 기전은 완전히 이해되지 않는다(문헌참조:Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016; 117:351-354; Lim JS, Lee DH. Changes in bone mineral density and body composition of children with well-controlled homocystinuria caused by CBS deficiency. Osteoporos Int 2013; 24:2535-2538, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 CBSDH 환자에서 많은 결합 조직 장애는 피브릴린-1 유전자의 돌연변이에 의해 유발된 결합 조직 장애인 마르판 증후군에서 나타는 것들과 유사하고 장골의 연장 및 골다공증 유형 골절을 포함하는 특성을 특징으로 한다(문헌참조: Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상승된 Hcy 수준은 두 가지 별개의 경로를 통해 골 취약성과 골절을 유도하는 것으로 사료된다(문헌참조: Behera *et al.* J Cell Physiol 2016, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 첫 번째 결과는 손상된 피브릴린 어셈블리를 통해 어린 시절과 청소년기 동안에 골 질량 증가물의 감소를 유도한다. 두 번째 경로는 손상된 골 리모델링을 유도하여 감소된 콜라겐 가교결합 형성을 통해 취약한 골을 유도한다(문헌참조: Behera *et al.* J Cell Physiol 2016; Kang *et al.* J Clin Invest 1973; 52:2571-2578, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).함께, 이들 데이터는 골격 성장에 중요한 시기인 아동기 및 청소년기 동안의 골 질량 축적이 CBSDH 환자에서 결핍되고, 이는 최대 골 질량 달성에 음성적으로 영향을 미침을 시사한다.

[0243] **[0200]** 더욱이, 노인 집단에서 Hcy 수준과 골절 위험 사이에는 강한 관계가 존재한다(문헌참조: Sato *et al.* Bone 2005; 36:721-726; van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004; 350:2033-2041; McLean *et al.* N Engl J Med 2004; 350:2042-2049; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 2,406명의 55세 이상의 대상체를 포함한 2건의 전향적, 집단 기반의 국제 연구 결과는 가장 높은 연령별 사분위수의 호모시스테인 수준은 골절 위험이 1.9배 증가하는 것과 관련이 있다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004; 350:2033-2041, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 증가된 호모시스테인 수준은 일반 집단에서 노인 남성과 여성의 골다공증성 골절에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자였으며, 그 규모는 골절 (낮은 골 미네랄 밀도, 인지 손상, 최근 낙상) 및 심혈관 질환에 대한 확립된 위험 인자와 유사하였다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 추가로, 1,999명의 대상체의 미국 전향적 연구(HOPE-2 시험 하위 연구)는 최고 사분위수의 혈청 tHcy 수준이 가장 낮은 사분위수의 혈청 thcy 수준과 비교하여 고관절 골절 위험을 여성에서는 1.9배 및 남성에서는 4배 증가시키는 것과 연관이 있음을 밝혔다(문헌참조: Sawka *et al.* Arch Intern Med. 2007 Oct 22;167(19):2136-9, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). tHcy 수준과 골절 위험 사이의 연관성은 BMD 및 기타 잠재적인 골절 위험 요소와 무관하였다(문헌참조: van Meurs *et al.* N Engl J Med 2004;350:2033-2041; McLean *et al.* N Engl J Med 2004;350:2042-2049; Sawka *et al.* Arch Intern Med. 2007 Oct 22;167(19):2136-9; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이러한 결과와 일치하게, 65세<의 뇌졸중 환자 433명을 대상으로 한 연구는 1000명의 사람-년당 연령에 따른 고관절 골절 발생률이 Hcy 수준의 가장 낮은 사분위수에서 2.89에서 가장 높은 사분위수에서 27.87로 거의 선형으로 증가됨을 밝혔다(문헌참조: Sato *et al.* Bone 2005; 36:721-726, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 함께, 이들 결과는 증가된 Hcy 수준이 노인 남성 및 여성에서 골다공증성 골절에 대한 강력하고 독립적인 위험 인자임을 시사한다.

[0244] **[0201]** CBSDH 환자에서 낮은 BMD 및 골격 취약성을 초래하는 정확한 기전은 완전히 이해되지 않는다(문헌참조:Weber *et al.* Mol Genet Metab 2016; 117:351-354; Lim JS, Lee DH. Changes in bone mineral density and body composition of children with well-controlled homocystinuria caused by CBS deficiency. Osteoporos Int 2013; 24:2535-2538, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나 CBSDH 환자에서 많은 결합 조직 장애는 피브릴린-1 유전자의 돌연변이에 의해 유발된 결합 조직 장애인 마르판 증후군에서 나타는 것들과 유사하고 장골의 연장 및 골다공증 유형 골절을 포함하는 특성을 특징으로 한다(문헌참조: Brenton *et al.* J Bone Joint Surg Br 1972; 54:277-298; Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0245] **[0202]** 건강한 개체에서 피브릴린-1은 콜라겐 및 엘라스틴 중합체와 함께 어셈블리되어 골 형성, 항상성 및 복구를 위한 구조적 스캐폴드인 ECM을 형성한다(문헌참조: Olivieri *et al.* Fibrogenesis Tissue Repair 2010; 3:24, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 연구는 상승된 thcy 수준이 피브릴린-1 단편의 구조적 변형을 유도하여, 다량체화를 방지하고 피브릴린-1 분해를 유도함을 보여준다(문헌참조: Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2005; 280:34946-34955; Hubmacher *et al.* J Biol Chem 2010; 285:1188-1198, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 공정은 피브릴린-1 다량체화에 필요한 피브로넥틴-피브릴린 복합체의 형성을 방지하는 피브로넥틴의 호모시스테인화에 의해 더욱 손상된다(문헌참조: Hubmacher *et al.* Biochemistry 2011; 50:5322-5332, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 발견은 상승된 Hcy 수준이 ECM 형성에 대해 해로운 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0246] **[0203]** 건강한 개체에서, 피브릴린 어셈블리(즉, 미세섬유)는 형질전환 성장 인자-베타(TGF-베타) 및 골 형태형성 단백질(BMP)의 저장 및 활성화를 통해 골 미네랄화에 중요한 역할을 한다(문헌참조: Nistala *et al.* Ann N Y Acad Sci 2010; 1192:253-256; Nistala *et al.* J Biol Chem 2010; 285:34126-34133, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). TGF-베타 및 BMP의 손상된 활성화는 잠재적으로 마르판 증후군과 CBSDH 둘다에서 관찰되는 골격 표현형에 기여할 수 있으며 경미한 형태의 CBSDH에서 관찰되는 바와 같이 골 미네랄 함량을 감소시킬 수도 있다(문헌참조: Herrmann *et al.* Clin Chem 2005; 51:2348-2353, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 더욱이, Hcy가 감소된 콜라겐 가교결합 형성을 통해 골 강도를 약화시킬 수 있다는 생체내 및 시험관내 증거가 있다(문헌참조: Kang *et al.* J Clin Invest 1973; 52:2571-2578, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 함께, 이들 데이터는 골격 성장에 중요한 시기인 아동기 및 청소년기 동안의 골 질량 축적이 CBSDH 환자에서 결핍되고, 이는 최대 골 질량 달성에 음성적으로 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

[0247] **[0204]** 골 침착에 대한 효과 외에도, 상승된 Hcy 수준은 파골 세포(OC) 활성을 증가시키고 조골 세포(OB) 활성을 감소시킴에 의해 골 리모델링 속도를 증가시킨다(문헌참조: Behera *et al.* J Cell Physiol 2016; Herrmann *et al.* Clin Chem 2005; 51:2348-2353; Vacek *et al.* Clin Chem Lab Med 2013; 51:579-590; Vijayan *et al.* J Endocrinol 2017; 233:243-255, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). OB와 OC 활성 간의 불균형은 취약한 골 및 골절의 증가된 발생률을 유도할 수 있다. OB 활성의 Hcy 매개 감소를 유도하는 기전은 감소된 골 혈류(NO 가용성 감소의 결과)를 포함하는 것으로 사료된다(문헌참조: Tyagi *et al.* Vasc Health Risk Manag 2011; 7:31-35, which is hereby incorporated by reference in its entirety) and increased rates of OB apoptosis (FIG. 2 and Tables 14) (문헌참조: Behera *et al.* J Cell Physiol 2016; Kim *et al.* Bone 2006; 39:582-590, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 증진된 OC 활성을 유도하는 기전은 증가된 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP) 활성을 통해 OC 분화 및 OC 활성을 모두 증진시키는, 증가된 세포내 ROS 수준을 포함하는 것으로 사료된다(문헌참조: Vacek *et al.* Clin Chem Lab Med 2013; 51:579-590, which is hereby incorporated by reference in its entirety) and suppression of OC apoptosis (see Behera *et al.* J Cell Physiol 2016; Herrmann *et al.* Clin Chem 2005; 51:2348-2353; Koh *et al.* J Bone Miner Res 2006; 21:1003-1011, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 실제로, 높은 Hcy 식이를 공급받은 CD1 마우스에 대한 최근 연구는 단기(7일) Hcy 투여가 조직 미네랄 밀도(TMD) 손실 및 OC 수 증가와 관련이 있는 반면 장기 Hcy 투여(30일 )는 OC 재프로그래밍, 아폽토시스 및 미네랄화를 유도하여 TMD를 복원했지만 조직 생체역학적 성질을 손상시킴을 보여주었다(문헌참조: Vijayan *et al.* J Endocrinol 2017; 233:243-255, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0248] **[0205]** 따라서, 상승된 Hcy 수준은 두 가지 별개의 경로를 통해 골 취약성과 골절을 유도할 수 있다(문헌참조: Behera *et al.* J Cell Physiol 2016, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 첫 번째는 손상된 ECM 형성과 피브릴린-1 관련 TGF-베타 및 BMP의 억제된 활성화를 통해 아동기 및 청소년기 동안 골량의 축적을 감소시킨다. 두 번째 경로는 손상된 골 리모델링을 유도하여 증가된 OB 활성을 위해 취약한 골을 유도한다.

[0249] **[0206]** 상승된 Hcy 수준은 골 미세 환경에서 증가된 산화 스트레스와 연관된다. 증가된 ROS는 파골세포 아폽토시스를 유도함으로써 파골세포 형성을 감소시킨다. 산화 스트레스에서 상기 증가는 슈퍼옥사이드 음이온의 생성을 통해 NO 가용성을 감소시키고, 이는 또한 골혈류 및 혈관형성을 감소시킬 수 있다. 상기 공정에 의해 생성된 ROS는 단핵구 융합에 의한 파골세포 형성을 활성화시키고 추가로 BMD 상실에 기여하고 골다공증을 유도한다.

[0250] **[0207]** Met 제한 없이 표준 설치류 먹이로 유지한 신생아 CBS 녹아웃(KO) 마우스에서 최근 연구는 재조합 페길화된 사람 절단된 CBS(PEG-CBS)를 사용하여 5개월 동안 CBS ET를 피하 투여하면 이들 동물에서 골 미네랄 밀도의 감소를 방지하였고, 이후 생활에서 처리된 동물에서 이들 값을 정상화시킬 수 있음을 밝혔다(문헌참조: see Majtan *et al.* Enzyme replacement prevents neonatal death, liver damage, and osteoporosis in murine homocystinuria. FASEB J 2017, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이 연구에서는 KO 모델과 CBSDH 환자를 특징화하는 체성분의 변화를 방지하였다. 혈장 및 조직 둘다에서, tHcy 및 Cys 수준은 정상화되었고, Cth 수준은 증가되었고, SAM/SAH 비율은 개선되었다.

[0251] **[0208]** 골격 결과에 대한 Hcy 저하 효과에 대한 지지 증거는 CBSDH가 있는 25명의 아일랜드 환자에 대한 25년 조사에서 유래한다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 연구에서, 골다공증(DXA가 아닌 방사선 검사로 진단됨)은 NBS에 의해 동정된 치료 비-순응 환자 3명 중 1명과 후기 진단을 받은 환자 4명 중 1명(2세에)에서 나타났다. 조기 치료에 순응한 18명의 환자(생후 6주부터)는 골다공증의 징후를 보이지 않았다.

[0252] **[0209]** 한국에서 5명의 CBSDH 환자(남자 3명, 여자 3명)를 대상으로 소규모 연구가 수행되었고, 모두 3.4년 동안 대사 조절이 양호한 어린 나이에 진단되었다(NBS 기간 동안 3명, 7세에 2명)(문헌참조: Lim *et al.* Osteoporos Int 2013; 24:2535-2538, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 진단시에 평균 혈장 tHcy 수준은 34.3 ±52.6 (13 내지 78.6) μmol/L이었다. 혈장 Met는 716 ±1347.6 (24.3 내지 1566) μmol/L이었고, 치료는 피리독신, 베타인 및 폴산이 보충된 낮은-Met 식이를 포함하였다. 모든 환자에 대한 체조성 측정 및 BMD는 한국 집단에 대한 정상 범위 내에 있었고, 시간 경과에 따른 골격 형태의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 3명의 환자(60%)는 경미한 T-L 척추 측만증(코브 각도(Cobb angle) 7.3°, 7.6° 및 10.3°)이 있었고 골절은 3명의 환자에서 4회 보고되었다. 이들 중에서, 2명은 스포츠 손상에 의해 유발되었고 1명은 교통 사고에 의해 유발되었다. 요추의 경미한 압박 골절의 2개의 사례는 방사선 촬영으로 검출되었고 중증의 요통의 병력이 보고되었다. 조기 진단을 받은 환자들은 후기 진단된 자들 보다 더 적은 골격 이상을 보여주었다. 그러나 상기 연구는 식이 요법 치료에 순응하고 tHcy 수준이 약간에서 중간 정도 상승한, NBS에 의한 조기 진단을 받은 환자조차도 어린 시절에 이미 골격 이상과 다발성 골절을 나타냈다는 것을 보여주었다.

[0253] **[0210]** 함께, 이러한 발견은 CBSDH 환자에서 골격 결과에 대한 조기 Hcy-저하 치료의 유익한 효과를 시사한다. 치료에 순응하는 환자에서 tHcy 수준이 저하되었지만 정상화되지 않았으며, 이러한 환자에서 골격 이상이 더 적었지만, 이 대부분의 젊은 환자 그룹에서 유의적인 음성 임상 결과(골다공증 및 골절)가 나타났다는 것을 주지해야 한다.

[0254] **C. 혈관 합병증**

[0255] **[0211]** CBSDH와 혈관 질환 사이의 관계는 1985년 동형 접합 CBSDH로 인해 Hcy 수치가 중등도 내지 중증으로 상승한 환자의 전염병학 연구에서 처음으로 입증되었다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37: 1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0256] **[0212]** 혈전 색전증은 CBSDH 환자의 이환율 및 조기 사망의 주요 원인이다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Yap S. J Inherit Metab Dis 2003; 26:259-265, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 치료받지 않은 CBSDH를 갖는 환자에서 혈전색전증 이벤트의 전체 비율은 대략 연간 10%이다(문헌참조: Cattaneo M. Semin Thromb Hemost 2006; 32:716-723, which is hereby incorporated by reference in its entirety), with risk increasing after surgery and during or immediately after pregnancy (see Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Novy *et al.* Thromb Haemost 2010; 103:871-873, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 혈전색전증은 모든 혈관에 영향을 미칠 수 있지만 CBSDH 환자에서 정맥 혈전증(특히 CSVT)이 동맥 혈전증보다 더 흔하다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Eslamiyeh *et al.* Iran J Child Neurol 2015; 9:53-57; Saboul *et al.* J Child Neurol 2015; 30:107-112, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 심혈관 사건, 특히 CSVT는 유아에서 보고되었지만(문헌참조: Mahale *et al.* J Pediatr Neurosci. 2017 Apr-Jun;12(2):206-207, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 보다 전형적으로는 젊은 성인에서 나타난다(문헌

참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0257] **[0213]** 혈전색전성 이벤트의 위험은 16세까지 대략 25%이고 29세까지는 50%였다. 1999년에, 행키 등(Hankey *et al.*)은 HCU의 모든 3개의 유전학적 원인 (CBSDH, MTHFR 결핍 및 비타민 $B_{12}$ 결핍)이 30세까지 모든 동형접합체의 절반에 영향을 미치면서 고위험의 미성숙한 심혈관 (CV) 질환과 연관되어 있음을 보고하였다(문헌참조: Hankey *et al.* Lancet 1999; 354:407-413, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 모든 3개의 장애에 통상적인 유일한 생화학적 변화는 혈청 Hcy 수준의 상승(흔히 100 μmol/L 초과) (문헌참조: Faeh *et al.* Swiss Med Wkly 2006; 136:745-756, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 여러 보고서는 thcy 수준을 감소시키는 것이 CBSDH 환자에서 이환율의 주요 원인인 혈관 질환의 발병률을 어떻게 유의적으로 감소시키는지를 기재하였다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447; Wilcken DE, Wilcken B. The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment. J Inherit Metab Dis 1997; 20:295-300, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그 이후로 많은 다른 연구는 CBSDH 환자에서 혈관 이벤트, 특히 정맥 혈전증의 위험이 증가했음을 입증하였다(문헌참조: Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279; Lussana *et al.* Thromb Res 2013; 132:681-684; Magner *et al.* J Inherit Metab Dis 2011; 34:33-37, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0258] **[0214]** 상승된 혈장 thcy 수준은 혈관 질환의 위험 인자이며 CBSDH의 존재 및 부재의 둘다에서 관상 동맥 질환 환자에서 사망률에 대한 강력한 예측인자입이다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279; Faeh *et al.* Swiss Med Wkly 2006; 136:745-756; Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057; Clarke R *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022; Hankey *et al.* Lancet 1999; 354:407-413; Khan *et al.* Stroke 2008; 39:2943-2949; Graham *et al.* The European Concerted Action Project. JAMA 1997; 277:1775-1781; Clarke *et al.* N Engl J Med 1991; 324:1149-1155; Clarke *et al.* Ir J Med Sci 1992; 161:61-65; Woodward *et al.* Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17:1-5; Refsum *et al.* Annu Rev Med 1998; 49:31-62; Yoo *et al.* Stroke 1998; 29:2478-2483; Selhub *et al.* N Engl J Med 1995; 332:286-291; Wald *et al.* BMJ 2002; 325:1202; Bautista *et al.* J Clin Epidemiol 2002; 55:882-887; Brattstrom *et al.* Atherosclerosis 1990; 81:51-60; Lussana *et al.* Thromb Res 2013; 132:681-684; Casas *et al.* Lancet 2005; 365:224-232; McCully KS. Am J Pathol 1969; 56:111-128; Magner *et al.* J Inherit Metab Dis 2011; 34:33-37; Wilcken *et al.* J Clin Invest 1976; 57:1079-1082; Nygard *et al.* N Engl J Med 1997; 337:230-236; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). tHcy 수준과 CV 위험 간의 관계에 대한 증거가 있지만(문헌참조: Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), the relationships between tHcy와 뇌졸중/말초 동맥 질환 간의 관계는 상당히 보다 강하였다(문헌참조: Clarke *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022; Khan *et al.* Stroke 2008; 39:2943-2949; Wald *et al.* BMJ 2002; 325:1202; Casas *et al.* Lancet 2005; 365:224-232; Brattstrom *et al.* Haemostasis 1989;19 Suppl 1:35-44; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일반 인구를 대상으로 한 대규모 연구(NORVIT, HOPE-2, VITATOPS)는 초기에 Hcy 수치를 저하시키는 것이 주요 혈관 질환 및 재발성 심혈관 질환에 미미한 영향을 미친다는 결론을 내렸지만, 데이터에 대한 보다 구체적인 뇌졸중에 대한 tHcy 감소의 임상적 이득을 명백히 보여주었다.

[0259] **[0215]** Hcy를 저하시키는 것이 thcy 수준이 약간 상승한 일반 집단에서 뇌졸중 위험을 감소시킨다는 상당한 증거가 있다(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372; Huo *et al.* JAMA 2015; 313:1325-1335; Lonn *et al.* N Engl J Med 2006; 354:1567-1577; Hankey *et al.* Lancet Neurol 2012; 11:512-520; Spence JD, Lancet Neurol. 2007 Sep;6(9):830-8, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 5.552명의 환자의 HOPE-2 연구(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에서, tHcy 수준 (위약에 비해 3mmol/L)에서 최소의 감소는 뇌졸중 발생율에서 유의적인 감소를 유도하였고(27%의 상대적 위험 감소, 1.3%의 절대 위험 감소), 이는 tHcy 수준에서의 작은 감소라도 이로울 수 있음을 시사한다. 상기 효과는 절대 위험도가 4.3% 감소한 상위 사분위의 기준선 Hcy를 가진 환자에서 가장 현저하였다. Hcy 저하가 CBSDH가 없고 tHcy가 약간 상승한 환자의 전반적인 CV 결과에 영향을 미치는지 여부는 불분명하지만(문헌참조: Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨), 이의 혈관 이득은 CBSDH 환자에서 계속적으로 입증되었다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747; Eslamiyeh *et al.* Iran J Child Neurol 2015; 9:53-57; Saboul *et al.* J Child Neurol 2015; 30:107-112; Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:2080-2085; Woods *et al.* BMJ Case Rep 2017; Wilcken *et al.* J Inherit Metab Dis 1997; 20:295-300; Yap *et al.* Semin Thromb Hemost 2000;

26:335-340; Ruhoy *et al.* Pediatr Neurol 2014; 50:108-111, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨).

[0260] 1. 기전

[0261] **[0216]** 많은 연구는 NF-kB를 통해 염증 및 면역 활성화를 포함하는 (문헌참조: Rodriguez-Ayala *et al.* Atherosclerosis 2005; 180:333-340; van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 상승된 Hcy 수준이 산화 스트레스 관련 기전을 통해 죽상 동맥 경화증 또는 혈전증의 발병에 기여한다는 것을 보여주었다(문헌참조: Faverzani *et al.* Cell Mol Neurobiol 2017; Nowak *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37:e41-e52; Vanzin *et al.* Mol Genet Metab 2011; 104:112-117; Vanzin *et al.* Gene 2014; 539:270-274; Vanzin *et al.* Cell Mol Neurobiol 2015;35:899-911; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 혈전증을 유도하는 의학적 손상은 Hcy-매개된 내피 기능부전(문헌참조: Jiang *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2515-2521; Hossain *et al.* J Biol Chem 2003; 278:30317-30327; Cai *et al.* Blood 2000; 96:2140-2148; Zhang *et al.* J Biol Chem 2001; 276:35867-35874; Papapetropoulos *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:21972-21977; Szabo *et al.* Br J Pharmacol 2011; 164:853-865; Chiku *et al.* J Biol Chem 2009; 284:11601-11612; Wang *et al.* Antioxid Redox Signal 2010; 12:1065-1077; Saha *et al.* FASEB J 2016; 30:441-456; Ebbing *et al.* JAMA 2008; 300:795-804; Bonaa *et al.* N Engl J Med 2006; 354:1578-1588; Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612; Celermajer *et al.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:854-858; Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 증진된 응고 경로(문헌참조see Spence JD. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7; Fryer *et al.* Arterioscler Thromb 1993; 13:1327-1333; Lentz *et al.* J Clin Invest 1991; 88:1906-1914; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 증가된 혈관 확장에 의해 유발되는 것으로 사료된다. 상기 혈전 촉진 기전은 마르판 환자에서 관찰된 것들과 유사하다(문헌참조: Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279; Tripathi P. International Cardiovascular Forum J 2016; 6:13; van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31; Hackam *et al.* JAMA 2003; 290:932-940; Baumbach *et al.* Circ Res 2002; 91:931-937; Evangelisti *et al.* Int J Cardiol 2009; 134:251-254; de Valk *et al.* Stroke 1996; 27:1134-1136, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0262] **[0217]** 27개 연구(4,000명 초과의 환자)의 데이터의 메타 분석(meta-analysis)으로부터 유래된 tHcy 수준과 CV 위험 사이의 인과 관계는 CV, 뇌혈관 및 말초 혈관의 죽상동맥경화증에 대한 등급화된 위험을 보여주었고, Hcy가 5μM 증가하면 여성의 경우 위험이 80% 증가하고 남성의 경우 위험이 60% 증가하였다(문헌참조: Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 5,073건의 허혈성 심장 질환(IHD) 사건과 1,113건의 뇌졸중을 포함하는 30건의 전향적 또는 후향적 연구의 데이터의 메타 분석은 평소보다 25% 낮은(회귀 희석 편향 보정) Hcy 수준(약 3μmol/L)이 11%(교차비(OR), 0.89, 95% CI, 0.83~0.96) 낮은 IHD 위험과 19%(OR, 0.81, 95% CI, 0.69 내지 0.95) 낮은 뇌졸중 위험과 관련이 있음을 밝혔다(문헌참조: Clarke R, *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0263] **[0218]** 기존 혈관 질환이 있거나 없는 환자를 대상으로 한 연구는 MI가 있는 대상체 1/21(5%), 대동맥 장골 질환이 있는 대상체 14/37(38%) 및 뇌혈관 질환이 있는 대상체 17/53(32%)에서 Met 부하 후 혈장 Hcy의 증가(상응하는 건강한 대조군 대상체에서 최대값 초과)를 입증하였다. 이것은 Hcy 수준과 말초 동맥 질환(PAD) 및 뇌졸중 사이의 연관성이 Hcy 수준과 MI 사이의 연관성보다 훨씬 더 크다는 것을 시사한다(문헌참조: Brattstrom *et al.* Haemostasis 1989;19 Suppl 1:35-44, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 457명의 뇌졸중 환자와 179명의 대조군 대상체의 동일한 커뮤니티에서 영국 코호트 중에서 수행된 전향적 연구에서 Hcy 수준과 뇌졸중 사이의 독립적이고 등급화된 연관성이 보고되었다(문헌참조: Khan *et al.* Stroke 2008;39:2943-2949). 최고 Hcy 수준은 소혈관 질환(SVD) 환자에서 나타났다(뇌졸중이 없는 대조군 대상체에서 16.2 대 11.8μmol/L, 연령, 성별, 혈관 위험 인자, 비타민 수준 및 신장 기능을 조정한 후 $p<0.001$). SVD 사례 내에서, 최고 Hcy 수준은 합류성 백혈구 확장증과 함께 열공 경색이 있는 개인에서 관찰되었다. 더욱이, Hcy 수준과 백혈구확장증 중증도 간에 상관관계가 있었다($r = -0.225$; $p<0.001$).

[0264] **[0219]** 이러한 발견은 Hcy 대사와 뇌졸중 위험을 조절하는 MTHFR 다형성 간의 유전학적 연관성을 입증하는 멘델식 무작위화 연구에 의해 추가로 뒷받침되었다(문헌참조: Casas *et al.* Lancet 2005; 365:224-232, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). Hcy 수준과 뇌졸중 위험에 대한 MTHFR TT 및 CC 다형성 간의 연관성에 대한 모든 관련 연구에 대한 문헌 검색은 심혈관 질환(CVD)이 없는 15,635명의 개체를 포함하여 111개의 연구를 동정하였다. TT와 CC 동형접합체 간의 Hcy 수준에서 가중된 평균 차이는 1.93 μmol/L (95% CI 1.38 내지 2.47)였다. 혈장 Hcy 수준의 5 μmol/L 증가가 뇌졸중에 대한 OR 1.59(1.29 내지1.96)에 상응하는 전향적 연구의 이전 메타 분석

결과를 기반으로 하여, TT 유전자형을 갖는 건강한 개체의 Hcy 수준에서 1.93 μmol/L 증가는 1.20(1.10 내지 1.31)의 뇌졸중에 대한 예상 OR을 유도한다(문헌참조: Wald et al. BMJ 2002; 325:1202, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이 결과와 일치하여 크한 등(Khan et al.)은 연령 그룹, 민족 또는 지리적 위치에 관계없이 TT 대 CC 동형접합체(p=0.29)의 뇌졸중에 대해 1.26(1.14 내지 1.40) OR을 보고하였다. 함께, 이러한 결과는 일반 집단에서 뇌졸중 발병의 Hcy 수준 상승에 대한 원인 역할을 시사하였다.

[0265] **[0220]** 혈관 질환은 일반 집단에서 수행된 것보다 훨씬 적은 연구에서 조사되었기 때문에 이형접합 CBSDH 환자에서 전형적인 혈청 Hcy의 적당한 증가 여부가 조사되었다. 머드 등 (Mudd et al.)에 따르면, 이형접합 CBSDH(50세까지 5%>)로 인해 tHcy 수준가 약간 상승한 환자에서 혈관 사건의 위험은 일반 집단의 위험과 유사하다(문헌참조: Mudd et al. Am J Hum Genet 1981; 33:883-893, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이와 일치하게, 동형접합 및 이형접합 CBSDH를 가진 개체에서 초음파 연구는 4세 정도로 어린 동형접합 어린이의 전신 동맥에서 손상된 내피 기능을 발견한 반면, 이형접합 성인에서는 내피 기능이 크게 영향을 받지 않았다(문헌참조: Celermajer *et al.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:854-858, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0266] **[0221]** 유사한 연구는 동형 접합체와 이형접합체 둘다에서 미성숙한 동맥 질환의 징후를 입증하였지만, 동형접합체 장애가 있는 개체는 훨씬 더 어린 나이(19세 대 45세)에 징후를 나타냈고 질환의 중증도는 상당히 더 컸다(문헌참조: Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0267] **[0222]** 전반적으로 CBSDH 환자의 관찰은 Hcy 수준에 따라 혈관 위험이 증가하는 이전 연구의 관찰과 일치하였다(문헌참조: Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057; Clarke *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022; Khan *et al.* Stroke 2008; 39:2943-2949; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0268] **[0223]** 이들 결과는 상승된 Hcy 수준이 CV 질환에 대한 위험 인자임을 시사한다. 또한 Hcy 수준을 저하시키는 것은 일반 집단과 CBSDH 환자에서 뇌졸중 위험을 크게 감소시키는 것으로 나타났다.

[0269] **[0224]** 연구는 CBSDH에 의해 유발된 상승된 Hcy 수준이 다양한 기전을 통해 잠재적으로 죽상동맥경화증 및/또는 혈전증의 발병에 기여할 수 있음을 보여주었다. 이들은 산화 스트레스 유도와 같은 분자적 사건과 NF-κB(활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄 인핸서)의 활성화와 같은 다운스트림 효과, 염증 촉진 및 기타 손상 관련 유전자를 조절하는 전사 인자를 포함한다. 혈관벽의 물리화학적 성질을 조절하는 다양한 Hcy 매개 효과, 예를 들어, 내피 기능부전 또는 동맥 경화를 유발하는 효과는 고혈압, 혈전증 또는 기타 혈관 이상의 발병에 기여할 수 있다. 최종적으로, 혈전증으로 이어지는 보다 직접적인 경로인 Hcy에 의한 응고 경로의 직접적인 유도에 대한 증거가 있다(문헌참조: Faverzani *et al.* Cell Mol Neurobiol 2017; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Ganguly *et al.* Nutr J 2015; 14:6; Tripathi P. Molecular and biochemical aspects of homocysteine in cardiovascular diseases. International Cardiovascular Forum J 2016; 6:13; Fryer *et al.* Arterioscler Thromb 1993; 13:1327-1333; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 죽상동맥경화증의 분자 및 생화학적 기전에 대한 간략한 기재에 이어 하기의 하위 섹션에서는 CBSDH갖는 개체를 포함하여 상승된 tHcy 수준을 갖는 개체에서 혈관 질환을 유도하는 잠재적 기전을 검토할 것이다.

[0270] **2. 죽상동맥경화증**

[0271] **[0225]** 혈전증 및 결과적으로 혈관 막힘으로 이어지는 가장 잘 연구된 병태 중에는 관상동맥, 대뇌 및 말초 순환에 영향을 미치는 진행성 염증 질환인 죽상동맥경화증이 있다(문헌참조: Libby *et al.* Circulation 2005; 111:3481-3488, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 조기 단계에서 혈관 손상은 내피 세포(EC) 활성화, 내막으로의 단핵구 동원 및 대식세포 활성화를 유도한다. 단핵구 유래 지질 함유 대식세포(거품 세포) 및 T-림프구를 포함하는 염증성 죽상동맥경화 병변(지방 줄무늬)이 형성된다. 점진적인 지질 축적은 섬유질 캡으로 둘러싸인 지질 코어를 형성한다. 후기 단계에서 활성화된 대식세포는 섬유질 캡을 약화시키는 효소를 분비하여 플라크 파열, 출혈 또는 혈전증 및 허혈 발작/급성 관상 동맥 증후군을 유도한다. 플라크 파열은 동맥 내강 내의 혈액에 조직 인자를 노출시켜 이것이 응고 인자 VII/VIIa와 복합체를 형성하도록 한다. 상기 공정은 응고 캐스케이드를 개시하여 혈전형성을 유도한다. 파괴된 플라크는 각각 부분 또는 전체 폐색을 일으키는 심장벽 또는 폐색 혈전증을 유도할 수 있다. 심장벽 혈전증은 허혈 증상, 예를 들어, 불안정 협심증을 유발하는 반면, 폐색성 혈전증은 급성 관상 이벤트, 예를 들어, MI 및 뇌졸중을 유도한다. 사이토킨은 죽상동맥경화증의 모든 단계에 관여하며 그 발병기전에 지대한 영향을 갖는다. 죽상동맥경화증에 이차적일 뿐만 아니라, 혈전증은 예를 들어 심방세동의 결과로 또는 응고 캐스케이드의 직접적인 활성화에 의해 플라크 형성이 부재인 경우에도 활성화될 수 있다.

[0272] **3. 산화 스트레스**

[0273] **[0226]** 상승된 Hcy 수준을 갖는 환자를 대상으로 한 연구는 다양한 조직에서 지질, 단백질 및 DNA 산화 손상을 반영하는 변경된 바이오마커에 의해 입증된 바와 같이 치료를 받은 환자와 특히 치료를 받지 않은 환자가 산화 스트레스에 민감한 것으로 나타났다(문헌참조: Vanzin *et al.* Mol Genet Metab 2011; 104:112-117; Vanzin *et al.* Gene 2014; 539:270-274; Vanzin *et al.* Cell Mol Neurobiol 2015; 35:899-911, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용된다). 산화 환원 항상성의 불균형으로 정의되는 산화 스트레스는 저밀도 지질단백질의 산화 변형, 내피 활성화 및 혈관 염증 반응의 개시와 관련된 죽상동맥경화증 및 관련 혈전증과 같은 혈관 병리학에서 중요한 역할을 한다(문헌참조: Nowak *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37: e41-e52, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 산화 스트레스는 증가된 ROS 수준(예를들어, 슈퍼옥사이드($O^{2-}$) 및 하이드록실($HO^{-}$) 라디칼 및 과산화수소($H_2O_2$)) 및/또는 감소된 수준의 조직 항산화제(예를들어, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 카탈라제 및 글루타티온 퍼옥시다제)로 인해 유발될 수 있다(문헌참조: Faverzani *et al.* Cell Mol Neurobiol 2017; Nowak *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37: e41-e52, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 건강한 개체에서, ROS는 정상 산화 대사의 부산물로서 생성된다. 그러나 추가로 ROS 생성은 담배 연기, 알콜 소비, 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 당뇨병 및 상승된 Hcy 수준과 같은 CV 위험 요인에 의해 유발된다.

[0274] **[0227]** 분자 수준에서, Hcy가 일부가 이전에 논의된 증가된 산화 스트레스를 유발할 수 있는 수많은 방식이 있다. 예를 들어, 혈관 벽에서 호모시스테인화된 단백질의 축적은 염증 및 결과적으로 활성화된 대식세포에 의한 ROS ($O^{2-}$) 생성을 촉진시킬 수 있다. 또 다른 잠재적인 기전은 NMDA 수용체의 Hcy 유도 활성화로, ROS 생성을 유도하는 신호 전달 경로를 촉발한다. 심장 미세혈관 EC에서 Hcy는 특히 활성화된 세포에서 높은 수준의 $O^{2-}$를 생성하는 세포 표면 효소인 NADPH 옥시다제의 증가된 수준을 유도하였다. 최근 연구(문헌참조: Chen *et al.* Sci Rep. 2017 Jul 31;7(1):6932, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 허혈 래트 뇌에서 Hcy가 증가된 ROS 생성의 예상된 결과 함께 미토콘드리아 기능부전을 유도함을 시사하였다. Hcy는 또한 유익한 혈관확장제 NO의 생체이용률을 감소시키는 것으로 사료된다. $O^{2-}$는 NO와 반응하여 반응성 질소 종인 퍼옥시니트라이트를 생성하며, 실제로 퍼옥시니트라이트 유도된 단백질 손상의 지표인 티로신 니트로화의 Hcy 유도 증가도 보고되었다(문헌참조: Tyagi *et al.* Vasc Health Risk Manag 2011; 7:31-35, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 보다 광범위하게, Hcy를 포함하는 티올-티올 상호작용은 세포 산화 환원 상태를 교란시킬 것으로 예상되고, 예를 들어, 환원된 글루타티온의 가용성을 잠재적으로 감소시키고 심지어 단백질 어셈블리 및 폴딩을 손상시킨다.

[0275] **[0228]** 치료 전후의 CBSDH 환자에 대한 연구에서 피리독신, 폴레이트, 베타인 및 비타민 $B_{12}$ 보충제를 사용한 치료는 환자의 지질 산화 손상을 약화시켰지만 조직 항산화 능력의 두 지표인 설프히이드릴 함량이나 총 항산화 상태는 변화시키지 않았다. 그럼에도 불구하고, 설프하이드릴 그룹 함량과 Hcy 수준 간의 유의적인 음성 상관관계가 있었고 지질 과산화 생성물인 말론디알데하이드의 수준과 Hcy의 수준 간에는 양성의 상관관계가 있다. 이것은 CBSDH에서 관찰된 산화 손상에서 Hcy에 대한 잠재적인 기계적 역할을 시사하였다(문헌참조: Vanzin *et al.* Mol Genet Metab 2011; 104:112-117, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 변경된 지질 프로필, 특히 고밀도 지단백질 수준 감소 및 염증 촉진 지질 종의 농축이 치료되지 않은 CBSDH 환자 및 치료된 CBSDH 환자의 혈장에서 관찰되었다(문헌참조: Vanzin *et al.* Cell Mol Neurobiol 2015; 35:899-911, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 다른 연구에서는 건강한 사람보다 CBSDH 환자에서 훨씬 더 많은 DNA 손상이 보고되었다(문헌참조: Vanzin *et al.* Gene 2014; 539:270-274, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 함께, 이들 발견은 상승된 Hcy 수준과 관련된 혈관 손상의 발병기전에 산화 스트레스를 내포한다. Met 수준과 산화 스트레스 관련 파라미터 사이에는 상관관계가 발견되지 않았으며, 이는 Met 및 그 유도체가 CBSDH의 산화 손상에 거의 기여하지 않는다는 것을 시사한다(문헌참조: Vanzin *et al.* Mol Genet Metab 2011; 104:112-117, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0276] **[0229]** 수많은 다른 분자 효과 중에서 산화 스트레스는 죽상동맥경화증 및 혈전증의 개시 및 진행에 관여하는 것으로 알려진 사이토킨과 같은 염증 촉진 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자 그룹인 NF-κB의 활성화와 관련이 있다(문헌참조: Rodriguez-Ayala *et al.* Atherosclerosis 2005; 180:333-340, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 시험관내 연구는 Hcy를 사용한 EC의 치료가 ROS 생성을 통해 Nf-kβ를 활성화시킴을 보여주었다(문헌참조: van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 유전자 발현을 조절하는 것 외에도 산화 스트레스에 의한 세포 거대 분자의 화학적 변형은 혈관계의 구조와 기능에 직접적인 영향을 미칠 수 있으며 섹션의 나머지 부분에서 논의된 바와 같이 다른 국소 또는 전신 효과를 가질 수

있다.

[0277] **4. 혈관 벽에서의 변화**

[0278] **[0230]** 내피 기능부전은 일반적으로 혈관 수축과 이완을 조절하는 내피 관련 인자 간의 불균형으로 정의된다. 이러한 인자 중 NO 또는 "내피 유래 이완 인자"가 가장 잘 알려져 있으며, 황화수소($H_2S$)가 보다 최근에 기재된 또 다른 인자이다(문헌참조: Jiang *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2515-2521, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 여러 시험관내 연구에서 Hcy가 매우 높은 수준으로 사용되었음에도 불구하고 내피 기능에 미치는 Hyc의 효과를 조사하였다(문헌참조: Jiang *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2515-2521; Hossain *et al.* J Biol Chem 2003; 278:30317-30327; Cai *et al.* Blood 2000; 96:2140-2148; Zhang *et al.* J Biol Chem 2001; 276:35867-35874; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 하나의 상기 연구는 Hcy로 처리된 사람 제대 정맥 내피 세포 (HUVEC)에서 언폴딩된 단백질 반응 및 프로그램화된 세포사를 보고하였지만, Hcy 농도는 중증으로 상승된 Hcy 수준을 갖는 환자에서 관찰된 것들 보다 수배 높았다(문헌참조: Zhang *et al.* J Biol Chem 2001; 276:35867-35874, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 다른 보고에서, Cth 확립에 관여하는 효소인 Cth 감마-리아제(CGL)는 상승된 Hcy 수준을 갖는 환자에서 과량의 $H_2S$를 생성하였다(문헌참조: Papapetropoulos *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:21972-21977; Szabo C *et al.* Br J Pharmacol 2011; 164:853-865; Chiku *et al.* J Biol Chem 2009; 284:11601-11612, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨). 증가된 $H_2S$ 수준이 부수적 혈관 성장, 모세혈관 밀도 및 국소 조직 혈류를 상당히 증가시키는 것으로 보고되었기 때문에 이 관찰은 중요하였다(문헌참조: Wang *et al.* Antioxid Redox Signal 2010; 12:1065-1077, 이의 전문이 참조로 인용됨). 그러나 높은 Hcy 수준(0.002 내지 2mM)은 시험관 내에서 EC 증식 또는 포스포-eNOS 수준에 유의한 영향을 미치지 않았다(문헌참조: Saha *et al.* Cystathionine beta-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration. FASEB J 2016; 30:441-456, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 전반적으로, 이러한 결과는 Hcy가 시험관 내에서 시험된 높은 Hcy 수준으로 인해 생체 내 EC에 직접적으로 영향을 미치는지의 여부는 아직 명확하지 않지만 내피 기능부전에서 Hcy의 가능한 역할을 시사한다.

[0279] **[0231]** 최근 약리학적 및 유전학적 연구에서, EC에서 CBS 기능의 상실은 세포 내 $H_2S$에서의 50% 감소 및 글루티온에서 400% 감소, 및 동시에 세포 ROS 수준에서의 증가와 연관이 있었다(문헌참조: Saha *et al.* FASEB J 2016; 30:441-456, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). EC에서 사일런싱 CBS는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 대한 표현형 및 신호전달 반응을 손상시켰고, 상기 효과는 혈관형성과 같은 내피 기능을 조절하는 1차 수용체인 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR-2) 및 뉴로필린-1 (NRP-1)의 감소된 전사체에 의해 악화되었다. VEGFR-2 및 NRP-1의 전사 하향조절은 $H_2S$의 황화 표적인 전사 인자 특이성 단백질 1 (Sp1)의 감소된 안정성에 의해 매개되었다. CBS 사일런싱 EC에서 글루타티온이 아닌 $H_2S$를 보충하면 VEGFR-2 및 NRP-1 발현 및 VEGF 의존성 세포 증식 및 이동이 증가할 뿐만 아니라 Sp1 수준과 VEGFR-2 프로모터에 대한 Sp1 결합이 회복되었다. 이것은 CBS-매개 단백질 S-황화가 혈관 건강과 기능을 유지하는 데 중요하다는 것을 시사하며, CBSDH 환자가 내피 기능부전을 나타내고(문헌참조: Celermajer *et al.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:854-858; Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195, 이의 둘다는 이의 전문이 참조로 인용됨) CBSDH 환자가 Hcy 수준이 다른 원인에 의해 상승된 개인에서 관찰된 혈관 손상 유형 뿐만아니라 추가적이고 뚜렷한 유형의 혈관 손상을 겪을 가능성을 높인다는 이전 관찰을 뒷받침한다.

[0280] **[0232]** 조절불능의 내피 기능 또는 혈관 수축에 대한 다른 효과는 혈압(BP) 이상을 유도할 수 있다. 혈장 Hcy 수준은 BP와 직접적인 관련이 있었고 엽산을 사용한 Hcy 저하는 BP 감소와 관련이 있었다(문헌참조: Tripathi P. Molecular and biochemical aspects of homocysteine in cardiovascular diseases. International Cardiovascular Forum J 2016; 6:13; Hackam *et al.* JAMA 2003; 290:932-940, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이들 효과를 유도하는 기전은 불명확하지만, Hcy 수준은 이완기 혈압 보다 수축기 혈압과 더 강하게 연관된다. 이것은 상승된 Hcy 수준이 동맥 경화를 증가시킨다는 것을 시사한다. 동맥 경화의 정도는 평활근 세포(SMC)의 수와 기능, ECM의 콜라겐:엘라스틴 비율, 콜라겐의 품질 및 내피 기능에 의해 크게 결정된다(문헌참조: Tripathi P. Molecular and biochemical aspects of homocysteine in cardiovascular diseases. International Cardiovascular Forum J 2016; 6:13, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0281] **[0233]** 잠재적으로 높은 수준의 Hcy는 증가된 SMC 증식, 콜라겐 생성 및 엘라스틴 섬유 형성으로 인해 증가된 동맥 경화와 관련이 있다(문헌참조: van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그러나, 이것은 또한 Hcy가 콜라겐 가교결합을 손상시킴에 의해 동맥 경화를 감소시킬

가능성이 있다. 미니피그를 대상으로 한 연구에서 식이로 인한 Hcy 상승은 과박동성 동맥, 수축기(확장기는 아님) 고혈압 및 대동맥 확장을 동반한 도관 동맥의 확장된 반응성 충혈을 동반한 "거대 동맥 증후군"을 유발하였다(문헌참조: van Guldener *et al.* Homocysteine and blood pressure. Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 또한 대동맥 경화와 상관관계가 있는 동맥벽 탄성판의 단편화도 있었다.

[0282] **[0234]** 이러한 발견과 일치하게, CBSDH가 있거나 없는 마우스에서 수행된 연구는 혈관벽의 단면적이 대조군 식이를 공급한 CBS+/+(324 ±18$m^2$) 마우스와 비교하여($p < 0.05$) 대조군 식이(437 ±22$M^2$)를 공급받은 CBS+/- 마우스 및 고함량-Met 식이를 공급한 CBS+/+(442 ±36$m^2$) 및 CBS+/-(471 ±46$m^2$) 마우스에서 유의적으로 높았다(문헌참조: Baumbach *et al.* Structure of cerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice. Circ Res 2002; 91:931-937, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0283] **[0235]** 최대 혈관 확장 동안, 대조군 식이의 CBS+/- 마우스와 고함량-Met 식이의 CBS+/+ 및 CBS+/- 마우스의 대뇌 세동맥에서 스트레스-변형률(stress-strain) 곡선은 대조군 식이의 CBS+/+ 마우스에 대한 곡선의 오른쪽으로 이동하였다. 이는 혈장 tHcy 수준이 상승된 마우스에서 대뇌 동맥 확장성이 더 크다는 것을 나타냈다. 이러한 결과는 상승된 Hcy 수준이 대뇌 혈관 비대를 유도하고 대뇌 혈관 역학을 변경하며, 두 효과 모두 잠재적으로 죽상동맥경화증이 없는 경우에도 혈전증, 예를 들어, 뇌졸중의 발병률 증가에 기여함을 시사한다(문헌참조: Baumbach *et al.* Circ Res 2002; 91:931-937, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0284] **[0236]** 상승된 Hcy가 혈관 확장에 미치는 영향에 대한 추가 지원은 CBSDH 및 193.6 내지 342 μmol/L 범위의 tHcy 수준을 가진 5명의 이탈리아 환자에 대한 연구에서 유래한다(문헌참조: Evangelisti *et al.* Int J Cardiol 2009; 134:251-254, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 환자는 가벼운 심장 판막 탈출증 및/또는 역류 및 결합 조직 징상의 징후를 보였다.

[0285] **5. 혈전증**

[0286] **[0237]** 상승된 Hcy 수준은 심부 정맥 혈전증, 대뇌 부비동 혈전증 및 망막 정맥 혈전증의 더 높은 위험과 관련이 있고(문헌참조: Spence JD. Lancet Neurol. 2007 Sep;6(9):830-8, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 여러 연구에서 MI 위험과의 연관성을 찾지 못했다. 이러한 결과와 일치하여 소규모의 추가 연구에서 CBSDH가 혈전증과 관련이 있지만 반드시 죽상동맥경화증과 관련이 있는 것은 아님을 시사한다. 가족성 고콜레스테롤혈증(FH) 및 CBSDH가 있는 환자의 혈관 영상은 FH 환자가 경동맥이 확산하고 국소적으로 두터워지고 혈류가 감소하는 내피 기능부전이 있는 반면 CBSDH 환자는 경동맥에 플라크가 거의 없었고 중대뇌 동맥내 중내막두께(intima-media thickness)(IMT)와 혈류속도 둘다에 관한 건강한 대조군 대상체와 유사하였다(문헌참조: Rubba *et al.* Stroke 1994; 25:943-950, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이 연구는 전형적인 죽상동맥경화성 병변이 CBSDH에서 혈전성 이벤트에 선행하는 데 요구되지 않을 수 있으며 혈전증으로 이어지는 내측 손상이 동맥 확장에 의해 유발될 수도 있음을 시사한다.

[0287] **[0238]** 상기 관찰에 대한 지원은 정상적인 Met-부하 시험 결과를 가진 12명의 건강한 대상체와 비교하여 효소적으로 입증된 이형접합 CBSDH를 가진 13명의 환자에서 경동맥 및 대퇴부 죽상동맥경화증(IMT 및 발목-상완 지수로 결정)의 유병률을 비교하는 연구로부터 유래한다(문헌참조: de Valk *et al.* Stroke 1996; 27:1134-1136, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 5개 동맥 분절 각각에서 평균 IMT 값, IMT 빈도 분포 또는 IMT에서 그룹 간에 어떠한 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 이들 결과는 이형접합성 개체가 너무 어려서(모두 50>세) 구조적 혈관 변화를 발달시키지 못한다는 사실에 의해 설명될 수 있다. 그러나, 이들 데이터는 또한 상승된 Hcy 수준이 주로 적어도 보다 젊은 환자에서 응고 캐스케이드에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 실제로 관련이 없는 3명의 CBSDH 환자에 대한 사례 보고에서 한 환자는 관강내 혈전증으로 인한 뇌졸중을 경험하고 다른 환자는 두개경추 동맥경화증의 증거 없이 심장 또는 동맥 혈전색전증을 경험한 것으로 나타났다(문헌참조: Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0288] **[0239]** 이러한 관찰과 일치하여 HUVEC 및 CV1 EC로의 Hcy의 부가는 항응고제, 단백질 C 및 트롬보모듈린을 비가역적으로 불활성화시켰다(문헌참조: Lentz *et al.* J Clin Invest 1991; 88:1906-1914, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 더욱이, 배양된 인간 EC로의 Hcy의 부가는 시간 및 농도 의존적 방식으로 응고 촉진 조직 인자 활성을 증가시켰다(문헌참조: Fryer *et al.* Arterioscler Thromb 1993; 13:1327-1333, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0289] **[0240]** 연구 둘다에서, Hcy는 이의 유리된 티올 그룹을 포함하는 기전을 통해 응고 경로를 증진시켰다. 함께, 이들 데이터는 혈관 응고 기전에서의 교란이 CBSDH 환자에서 증가된 혈관 위험에 기여하고, 이것은 Hcy의 죽상

동맥경화증에 대한 효과가 명백히 나타나기 전에 CBSDH 환자에서 조기의 역할을 수행한다는 가설을 지지한다.

[0290] **[0241]** 혈장 Hcy 수준을 저하시키는 것은 CBSDH 환자에서 및 일반 집단에서 혈관 합병증, 특히 뇌졸중의 위험을 감소시킨다.

[0291] **[0242]** 최근 분석은 일반 집단에서 tHcy 상승과 뇌졸중 위험 사이의 강력한 연관성을 밝혔다(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372; Spence JD. Homocysteine lowering for stroke prevention: Unravelling the complexity of the evidence. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7; Hankey *et al.* Lancet Neurol 2012; 11:512-520, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0292] **[0243]** 과거에, 상승된 Hcy 수준을 갖는 환자에서 Hcy 저하 중재의 이득은 혼합된 것처럼 보였고 일부 연구는 혈관 위험 감소를 보여주었고(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747; Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:2080-2085; Wilcken *et al.* J Inherit Metab Dis 1997; 20:295-300; Yap *et al.* Semin Thromb Hemost 2000; 26:335-340; Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372; Huo *et al.* JAMA 2015; 313:1325-1335; Hankey *et al.* Lancet Neurol 2012; 11:512-520, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨) 다른 연구는 어떠한 이득을 보여주지 않았다(문헌참조: Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612; Ebbing *et al.* JAMA 2008; 300:795-804; Bonaa *et al.* N Engl J Med 2006; 354:1578-1588; Liem *et al.* Heart 2005; 91:1213-1214; Toole *et al.* JAMA 2004; 291:565-575; B vitamins in patients with recent transient ischemic attack or stroke in the VITAmins TO Prevent Stroke (VITATOPS) trial: a randomized, double-blind, parallel, placebo-controlled trial (see Lancet Neurol 2010; 9:855-865; Albert *et al.* JAMA 2008; 299:2027-2036, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 많은 이들 시험은 Hcy 저하를 위해 비타민 중재, 주로 B 비타민 ($B_6$ 및 $B_{12}$) 및 폴레이트 보충을 시험하였다. 결과적으로 연구 결과는 대상체가 폴레이트 강화가 시행되는 지역에 살았는지, 코발라민 독성에 더 취약하게 만드는 신장 기능부전을 가졌는지, 노인에게서 비교적 흔한 흡수 불량과 관련된 비타민 $B_{12}$ 결핍을 갖는지 또는 항혈소판제 복용 중이었는지의 여부와 같은 교란 요인이 있었다. 이러한 최근 분석은 이러한 교란 요인을 고려하고 이러한 주요 변수를 고려할 때 높은 상승된 tHcy는 일반 집단에서 뇌졸중의 위험을 증가시킨다는 결론을 내렸다(문헌참조: Mudd *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000; 20:1704-1706; Spence JD. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7; Spence JD, Clin Chem Lab Med. 2013 Mar 1;51(3):633-7, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0293] **[0244]** Hcy-저하 치료요법은 CBSDH가 없는 개체에서도 뇌졸중의 위험을 감소시킨다. HOPE-2 (심장 결과 예방 평가 2) 시험에서, ≥55세의 성인 5,522명은 혈관 질환이나 당뇨병의 병력이 있고 최소한 하나의 추가 CV 위험 인자가 있으며 5년 동안 비타민 보충군(엽산, 비타민 $B_6$ 및 비타민 $B_{12}$) 또는 위약군으로 무작위 배정되었다(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 평균 기준선 Hcy 농도는 그룹 둘다에서 11.5μmol/L였으며 기준선에서 >0.2mg의 엽산을 함유하는 하루 비타민 보충제를 복용하는 환자는 연구에서 제외되었다. 전반적으로 Hcy 저하(위약 대비 평균 3.0μmol/L)는 뇌졸중(HR, 0.75; 95% CI, 0.59 내지 0.97)에서 유의적인 상대적인 위험 감소 27%(절대적 감소 1.3%) 및 허혈성 뇌졸중(HR, 0.81; 95% CI, 0.60 내지 1.09) 및 출혈성 뇌졸중(HR, 0.80; 95% CI, 0.32 내지 2.02)에서 유의적이지 않은 감소와 관련되었다. 하위 그룹 분석에서 뇌졸중의 상대적 위험은 기준선 Hcy 수준이 최고 사분위수(4.3% 절대 위험 감소)에 있는 환자에서 가장 많이 감소하였다. 치료 이득은 <69세 미만의 환자, 엽산 식품 강화가 없는 지역의 환자, 등록 시 항혈소판 또는 지질 저하 약물을 투여받지 않은 환자에서 최대였다. 따라서, HOPE-2 시험은 위약에 비해 비타민 B를 투여받은 개체에서 뇌졸중 발병률이 감소했다고 보고한 반면(위험비(HR) 0.75; 95% CI, 0.59 내지 0.97), MI의 위험은 치료 그룹 둘다에서 유사하였다( RR 0.98, 95% 신뢰구간, 0.85~1.14)(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372; Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ *et al.* Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. N Engl J Med 2006; 354:1567-1577, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0294] **[0245]** HOPE-2 시험의 결과와 일치하여, 최근 뇌졸중 또는 일과성 허혈 발작이 있는 8,164명의 환자를 메디안 3.4년 동안 비타민 B 또는 위약으로 이중 맹검 치료로 무작위 배정한 VITATOPS 시험의 하위 분석은 비타민 B가 기준선에서 항혈소판 치료요법을 받지 않은 환자 중에서 1차 복합 결과(뇌졸중, MI 또는 혈관성 원인으로 인한 사망)를 유의적으로 감소시켰다(17 대 위약군 21%, HR 0.76, 0.60 내지 0.96). 항혈소판 치료요법을 받은 개체에서 비타민 B의 유의한 효과는 관찰되지 않았다(문헌참조: Hankey *et al.* Antiplatelet therapy and the effects of B vitamins in patients with previous stroke or transient ischemic attack: a post-hoc sub-

analysis of VITATOPS, a randomized, placebo-controlled trial. Lancet Neurol 2012; 11:512-520, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 연구에서, tHcy 수준은 환자가 항혈소판 치료요법을 받았는지 여부와 관계없이 기준선에서 12.4 내지 13.7 μmol/L로부터 비타민 치료요법 후 9.9 내지10.5 μmol/L로 유의적으로 감소하였다(치료 그룹 둘다에서 p <0.0001)(문헌참조: Hankey *et al.* Lancet Neurol 2012; 11:512-520, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0295] **[0246]** 염증성 캐스케이드는 허혈성 뇌졸중 발병기전에 기여하는 것으로 사료된다. 3,224명의 참가자에서 파밍햄 오프스프링 연구(Framingham Offspring Study)로부터 보고서(문헌참조: Shoamanesh *et al.* Neurology. 2016 Sep;87(12):1206-11, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 상승된 수준의 tHcy 및 3개의 기타 염증 마커가 허혈성 뇌졸중의 위험과 강한 연관성이 있고 파밍햄 뇌졸중 위험 프로필 스코어의 예측 능력을 개선시킴을 밝혔다.

[0296] **[0247]** VISP 및 VITATOPS 연구의 데이터에 대한 메타 분석은 이전에 고용량 시아노코발라민에 노출되지 않은 정상 신장 기능을 가진 환자가 고용량 시아노코발라민(0.78, 0.67 내지 0.90, 상호작용 p=0.03)을 포함한 비타민 치료요법으로부터 유의적인 이득을 얻은 반면, 고용량 시아노코발라민(비타민 B의 한 형태)을 포함하는 비타민 치료요법은 신장 기능이 손상된 개체에서 뇌졸중 위험에 영향을 미치지 않았음을 밝혔다(RR 1.04, 95% CI 0.84~1.27)(문헌참조: Spence JD. Lancet Neurol. 2007 Sep;6(9):830-8, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이들 결과는 신장 기능이 현저히 손상된 환자에서 시안화물 축적과 관련된 신독성인 것으로 알려진 시아노코발라민의 잠재적 교란 효과를 시사하였다(문헌참조: Spence JD, Clin Chem Lab Med. 2013 Mar 1;51(3):633-7, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이와 일치하게, DIVINe 시험(신장병증의 비타민을 사용한 당뇨병 중재)에서 1000μg의 시아노코발라민을 포함한 고용량 비타민 B는 유해하여 eGFR 감소를 악화시켰다(문헌참조: Spence JD. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7; House *et al.* JAMA 2010; 303: 1603-1609, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이와 함께 이러한 발견은 시아노코발라민 대신 메틸코발라민과 같은 비타민 B를 함유하는 비-시안화물을 사용하여 뇌졸중 위험이 높은 개체, 특히 신부전 환자의 Hcy 수치를 저하시키는 것을 지지한다.

[0297] **[0248]** 시아노코발라민 및 시안화물 독성은 CSPPT (중국 뇌졸중 1차 예방 시험)(China Stroke Primary Prevention Trial)으로부터 결과에 의해 신장 손상의 존재하에 교란 인자로서 이전의 시험에 추가로 연관되었다(문헌참조: Huo *et al.* JAMA. 2015 Apr 7;313(13):1325-35, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CSPPT에서 신장 손상으로 입증된 치료 이득은 후자의 시험에서 시아노코발라민 치료로 인한 것일 수 있는 DIVNe, VISP 및 VITOPS 시험에서 관찰된 이득의 부재와 상반된다.

[0298] **[0249]** 중국에서는 폴레이트 강화가 아직 시행되지 않았기 때문에 대형 집단에서 엽산 보충이 tHcy 수준을 저하시키는 효과가 연구될 수 있다. CSPPT는 뇌졸중이나 MI의 병력이 없는 고혈압이 있는 성인 20,702명을 대상으로 실시한 무작위 이중 맹검 시험으로, 엽산이 첫 번째 뇌졸중의 위험(엽산 부재하에 2.7 대 3.4%, HR 0.79, 95% CI 0.68 내지 0.93), 첫 번째 허혈성 뇌졸중(엽산 부재하에 2.2 대 2.8%, HR 0.76, 95% CI 0.64 내지 0.91) 및 복합 CV 사건(CV 사망, MI 및 뇌졸중; 엽산 부재하에 3.1% 대 3.9%, HR 0.80; 95% CI 0.69 내지 0.92)의 위험을 유의적으로 감소시킴을 입증하였다. 대조적으로, 출혈성 뇌졸중의 위험, 모든 원인으로 인한 사망 또는 AE의 빈도에서 두 그룹 사이에 유의적인 차이가 없었다. CSPPT의 하위 연구에서(문헌참조: Xu *et al.* JAMA Intern Med. 2016 Oct 1;176(10):1443-1450, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 신장 손상 (eGFR 60 mL/min/1.73 $m^2$ 미만의 eGFR)이 있거나 없는 대상체 둘다는 엽산으로부터 이득을 얻었고, 상기 하위 연구는 추가로 엽산으로 처리된 그룹이 엽산을 투여받지 않은 그룹에서의 경우 보다 혈청 Hcy가 훨씬 감소하였다(각각, 1.9 대 0.2 μmol/L, p<0.001).

[0299] **[0250]** 2017년 코크란(Cochrane) 검토(문헌참조: Mart-Carvajal et al. Cochrane Database Syst Rev. 2017 Aug 17;8:CD006612, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 74,422명의 참가자가 포함된 15개의 무작위 제어 시험을 분석하였고, 뇌졸중에 대한 비타민 B의 Hcy 저하 효과에서의 작은 차이, Mi에 대한 효과 부재, 임의의 원인 또는 AE로 인한 사망을 보고하였다. 위약/표준 치료와 비교하여, Hcy를 저하시키는 중재는 비치명적 또는 치명적 뇌졸중의 발생률 감소와 관련이 있었지만(4.33% 대 대조군의 경우 5.1%, RR 0.90, 95% CI 0.82 내지 0.99) 일반 집단에서 비치명적 또는 치명적 MI의 발생률에는 효과를 갖지 않았거나(7.1% 대 위약의 경우 6.0%, 상대 위험도(RR) 1.02, 95% CI 0.95 내지 1.10) 임의의 원인으로 인해 사망하였다(11.7% 대 위약의 경우 12.3%, RR 1.01, 95% CI 0.96 내지 1.06). 상기 검토는 CV 사건에 대한 Hcy 저하 중재의 효과를 뒷받침하는 증거가 없다고 이전에 결론을 내린 세 가지 조기 버전(2009, 2013 및 2015)이 업데이트된 것이었고, 2015년 검토는 뇌졸중의 감소된 발병률에서 유의적이지 않은 경향을 지적하였다(문헌참조: Marti-Carvajal Cochrane

Database Syst Rev 2015;1:CD006612, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 뇌졸중에 대한 Hcy 저하 중재에 대한 증거의 강도는 추가 시험이 가능해짐에 따라 더욱 강력해졌다.

[0300] **[0251]** 상기 검토에 포함된 연구는 Hcy-저하 치료요법으로서 비타민 보충의 다양한 용법을 사용하였다(문헌참조: Mart-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev. 2017 Aug 17;8:CD006612, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 2017년 검토는 2015년 검토의 것들에 3개의 새로운 시험을 부가하였다. 총 10건의 시험에서는 피리독신과 비타민 $B_9$(폴레이트) 및 $B_{12}$를 사용하였고 5건은 비타민 B9만 사용했으며 10건 중 1건은 엽산 대신 5-메틸테트라히드로폴레이트를 사용하였다. 일부 시험은 병행 약물 (대조군 및 비타민 처리된 그룹 둘다에서)을 포함하였고, 7개 시험은 지질저하제를 포함하였고, 하나는 항-고혈압제를 가졌다. 전반적으로, Hcy-저하 처리는 평균 tHcy 수준에서 비교적 작은 감소를 유도하였다. 더욱이, 엽산-강화 집단에서 3건의 연구가 수행되었고 혼합 집단에서 2건(일부 대상체는 강화 식이를 받았고 다른 대상체는 그렇지 않음)이 수행되었으며, 이는 Hcy 저하 효과를 차폐시킬 수 있다. 그러한 연구에 영향을 미칠 수 있는 교란 인자를 고려할 때, 보다 조기의 검토에서 비타민 치료 용법의 유의적인 CV 효과를 확인하지 못했고 최신 검토에서 뇌졸중에 대한 약간의 효과만 보고된 것은 놀라운 일이 아니다. 또한 코크란(Cochrane) 검토에 포함된 연구에서 Hcy 수준의 상승의 많은 잠재적 원인이 조사되지 않았다는 점도 주목할만하다(문헌참조: Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH가 있는 환자와 일반 집단에서 보다 젊은 연령에서 혈관 위험의 병태생리에 영향을 미치는 추가 요인이 있을 수 있다. Hcy 수준의 약간의 감소조차도 뇌졸중 위험 감소와 유의하게 관련되어 있다는 점은 주목할만하다.

[0301] **[0252]** 이러한 여러 분석에서 발생하는 흥미로운 의문은 왜 일부 연구에서 Hcy 수준이 뇌졸중에 미치는 효과를 나타내지만 MI에는 효과를 미치지 않는 것으로 나타났는지의 이유이다. 상기 의문과 관련하여 Spence(문헌참조: Spence JD. Lancet Neurol. 2007 Sep;6(9):830-8, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 MI와 뇌경색 사이의 주요 차이점을 지적하였고, 혈전증/색전증과 밀접하게 관련되어 있지만 거의 모든 MI 이벤트에서 관상동맥의 플라크 파열에 이차적인 동일계 혈전증이 있다. 따라서, 스펜스(Spence)는 상당 부분의 뇌졸중이 상승된 tHcy와 연관될 수 있는 혈전 과정과 관련되는 것으로 결론지었다.

[0302] **[0253]** 상승된 tHcy 수준은 심장색전성 뇌졸중뿐만 아니라 죽상색전성 및 열공 경색에서도 중요할 수 있다. 항응고 치료요법으로 치료받은 심방세동이 있는 노인 환자를 대상으로 한 연구는 높은 수준의 tHcy(>90 백분위수)가 허혈성 합병증의 4.7배 증가와 관련이 있음을 밝혔다(문헌참조: Poli *et al.* J Am Coll Cardiol 2009; 54:999-1002, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 잠복성 허혈성 뇌졸중 환자를 대상으로 한 또 다른 연구는 난원공(뇌경색의 위험 인자)이 있는 환자가 그렇지 않은 환자보다 혈장 tHcy 수준이 유의적으로 높았다(각각 8.9 ±3 대 7.9 ±2.6 μmol/L, p=0.021)(문헌참조: Ozdemir *et al.* J Neurol Sci 2008; 275:121-127, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 발견을 검토시에, 스펜스(문헌참조: Spence JD. Homocysteine lowering for stroke prevention: Unravelling the complexity of the evidence. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)는 Hcy가 주로 적색 혈전(정체 상태에서 형성되는 포집된 적혈구가 있는 섬유소 중합체 메쉬)의 형성에 영향을 미치지만 열공 경색 및 경동맥 플라크도 tHcy의 수준이 경두개 도플러 상의 미세색전증(16.2 vs. 10.1mmol/L) 환자에서 유의적으로 더 높기 때문에 tHcy와 유의적으로 관련이 있고, 이러한 미세색전의 대부분이 이중 항혈소판 치료요법에 의해 감소된 혈소판 응집체인 것으로 사료됨을 시사하였다(문헌참조: Spence JD. Homocysteine lowering for stroke prevention: Unravelling the complexity of the evidence. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0303] **[0254]** 32명의 CBSDH 환자(9세에서 66세 사이)를 대상으로 총 539명의 환자-년 동안 피리독신, 엽산 및 히드록소코발라민을 사용하여 수행된 연구는 치료 중 2건의 혈관 사건(1건의 치명적인 폐색전 및 1건의 MI)을 보고하였다(문헌참조: Wilcken *et al.* J Inherit Metab Dis 1997; 20:295-300, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 머드 (Mudd) 등의 역학 연구에 따르면, 치료가 없는 동일한 기간 동안 21건의 사건이 예상된다(RR 0.09(95% CI 0.02~0.38), p=0.0001). 3개국에서 2.5세에서 70세 사이의 84명의 환자에서 수행된 두 번째 연구는 1314명의 환자-년 치료 기간 동안 5건의 정맥 색전증(VE) 사례, 1건의 폐 색전증, 2건의 MI 및 2건의 복부 동맥류를 보고하였다(문헌참조: Yap *et al.* Semin Thromb Hemost 2000; 26:335-340, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 머드 등 등에 따르면(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 53건의 VE는 치료받지 않은 환자에서 예상되었다(RR 0.091 (95% CI 0.043 내지 0.190); p <0.001).

[0304] **[0255]** 이들 결과를 지지하는 증거는 CBSDH가 있는 158명의 환자를 대상으로 한 대형 국제 다중센터 관찰 연구로부터 유래하고(문헌참조: Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:2080-2085, 이의 전문이 본원

에 참조로 인용됨), 대다수는 10 내지 30세 연령 범위이다. 상기 연구에서, 17건의 혈관 이벤트는 12명의 치료받은 개체 중에서 관찰되었고, 3건이 폐 색전증이고, 2건은 MI이고, 5건은 심정맥 혈전증이고, 3건의 심혈관 질환이고, 1건은 일과성 허혈성 발작이고, 1건은 시상동(sagittal sinus) 혈전증이고, 2건은 복부 대동맥류(abdominal aortic aneurysm)이다. 치료가 없는 경우, 112건의 혈관 이벤트는 유사한 집단에서 예상되었다(RR 0.09 (95% CI 0.036 내지 0.228); p <0.0001). 상기 연구는 또한 치료를 받고 광범위하게 추적된 젊은 성인 CBSDH 환자가 일반 집단과 비교하여 어떻게 임상 결과가 좋지 않은지를 강조한다.

[0305] **[0256]** 상승된 혈장 thcy 수준은 혈관 질환의 위험 인자이며 CBSD의 존재 및 부재의 둘다에서 CAD 환자에서 사망률에 대한 강력한 예측인자입이다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279; Faeh *et al.* Swiss Med Wkly 2006; 136:745-756; Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057; Clarke R *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022; Hankey *et al.* Lancet 1999; 354:407-413; Khan *et al.* Stroke 2008; 39:2943-2949; Graham *et al.* JAMA 1997; 277:1775-1781; Clarke *et al.* N Engl J Med 1991; 324:1149-1155; Clarke *et al.* Ir J Med Sci 1992; 161:61-65; Woodward *et al.* Blood Coagul Fibrinolysis 2006; 17:1-5; Refsum *et al.* Annu Rev Med 1998; 49:31-62; Yoo *et al.* Stroke 1998; 29:2478-2483; Selsun *et al.* N Engl J Med 1995; 332:286-291; Wald *et al.* BMJ 2002; 325:1202; Bautista *et al.* J Clin Epidemiol 2002; 55:882-887; Brattstrom *et al.* Atherosclerosis 1990; 81:51-60; Lussana *et al.* Thromb Res 2013; 132:681-684; Casas *et al.* Lancet 2005; 365:224-232; McCully KS. Am J Pathol 1969; 56:111-128; Magner *et al.* J Inherit Metab Dis 2011; 34:33-37; Wilcken *et al.* J Clin Invest 1976; 57:1079-1082; Nygard *et al.* N Engl J Med 1997; 337:230-236; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0306] **[0257]** tHcy 수준과 CV 위험 간의 원인 관계에 대한 입증 중에서(문헌참조: Boushey *et al.* JAMA 1995; 274:1049-1057, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 동형접합성 및 이형접합성 *CBS* 돌연변이 둘다를 갖는 환자의 경우를 포함하는(문헌참조: Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) tHcy와 뇌졸중 또는 PAD 사이에서 입증되었다(문헌참조: Clarke *et al.* JAMA 2002; 288:2015-2022; Khan *et al.* Stroke 2008; 39:2943-2949; Wald *et al.* BMJ 2002; 325:1202; Casas *et al.* Lancet 2005; 365:224-232; Brattstrom *et al.* Haemostasis 1989;19 Suppl 1:35-44, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0307] **[0258]** 잠재적으로 상승된 Hcy를 혈관 손상과 연결하는 기전은 다양하고 복잡하다. 여러 연구는 NF-kB를 통한 염증/면역 활성화에 으한 것을 포함하는 (문헌참조: Rodriguez-Ayala *et al.* Atherosclerosis 2005; 180:333-340; van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 산화 스트레스가 연루되었음을 보여주었다(문헌참조: Faverzani *et al.* Cell Mol Neurobiol 2017; Nowak *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2017;37:e41-e52; Vanzin *et al.* Mol Genet Metab 2011; 104:112-117; Vanzin *et al.* Gene 2014; 539:270-274; Vanzin *et al.* Cell Mol Neurobiol 2015;35:899-911; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이러한 염증 과정이 죽상경화증의 특징인 반면, 전형적인 죽상경화성 병변은 CBSDH 환자에서 혈전성 사건에 선행할 필요가 없다(문헌참조: Rubba *et al.* Stroke 1994; 25:943-950; de Valk *et al.* Stroke 1996; 27:1134-1136, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 대신, 혈전증을 유도하는 내측 손상은 Hcy-매개된 내피 기능부전(문헌참조: Marti-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev 2015;1:CD006612; Celermajer *et al.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:854-858; Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195; Jiang *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005; 25:2515-2521; Hossain *et al.* J Biol Chem 2003; 278:30317-30327; Cai *et al.* Blood 2000; 96:2140-2148; Zhang *et al.* J Biol Chem 2001; 276:35867-35874; Papapetropoulos *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106:21972-21977; Szabo *et al.* Br J Pharmacol 2011; 164:853-865; Chiku *et al.* J Biol Chem 2009; 284:11601-11612; Wang *et al.* Antioxid Redox Signal 2010; 12:1065-1077; Saha S, *et al.* FASEB J 2016; 30:441-456; Ebbing *et al.* JAMA 2008; 300:795-804; Bonaa *et al.* N Engl J Med 2006; 354:1578-1588, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 증진된 응고 경로(문헌참조: Spence JD. Int J Stroke. 2016 Oct;11(7):744-7; Fryer *et al.* Arterioscler Thromb 1993; 13:1327-1333; Lentz *et al.* J Clin Invest 1991; 88:1906-1914, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 마르판 환자에서 연루된 혈전증 과정과 유사하게, 증가된 혈관 확장(문헌참조: Kelly *et al.* Neurology 2003; 60:275-279; Tripathi P. Molecular and biochemical aspects of homocysteine in cardiovascular diseases. International Cardiovascular Forum J 2016; 6:13; van Guldener *et al.* Curr Hypertens Rep 2003; 5:26-31; Hackam *et al.* JAMA 2003; 290:932-940; Baumbach *et al.* Circ Res 2002; 91:931-937; Evangelisti *et al.* Int J Cardiol 2009; 134:251-254; de Valk *et al.* Stroke 1996;

27:1134-1136, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 의해 유발되는 것으로 사료된다. CBSDH 환자에서 내피 기능부전의 관찰과 일치되게, 약리학적 및 유전학적 연구는 혈관 건강 및 기능의 유지에서 CBS-매개된 단백질 S-황화가 연루되었음을 보여주었다(문헌참조: Celermajer *et al.* J Am Coll Cardiol 1993; 22:854-858; Rubba *et al.* Metabolism 1990; 39:1191-1195, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 따라서 CBSDH 환자의 혈관 손상 기전이 CV 질환이 있는 일반 집단에서 보다 더 다양할 가능성이 있다.

[0308] **[0259]** Hcy를 저하시키는 것이 CBSDH가 있거나 없는 개체에서 뇌졸중 위험에 대해 이롭다는 상당한 증거가 있다(문헌참조: Saposnik *et al.* Stroke 2009; 40:1365-1372; Huo *et al.* JAMA 2015; 313:1325-1335; Lonn *et al.* N Engl J Med 2006; 354:1567-1577; Hankey *et al.* Lancet Neurol 2012; 11:512-520; Spence JD, Lancet Neurol. 2007 Sep;6(9):830-8, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일반 집단을 대상으로 수행된 연구에서 평균 기준선 Hcy 수준이 상대적으로 낮았지만, 뇌졸중 발병률의 감소는 Hcy 저하 중재와 유의한 상관관계가 있었으며, 이는 tHcy 수준이 적게 감소해도 이득이 됨을 지적한다.

[0309] **[0260]** 관련 시험에 대한 업데이트된 검토는 뇌졸중에서 Hcy를 저하시키는 치료의 이로운 효과를 지지한다(문헌참조: Martí-Carvajal *et al.* Cochrane Database Syst Rev. 2017 Aug 17;8:CD006612, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 폴레이트 강화, 비타민 $B_{12}$ 결핍 또는 환자를 고용량 시아노코발라민에 취약하게 만드는 신장 기능부전이 있는지의 여부, 또는 대상체가 항혈소판제를 복용 중인지 여부와 같은 교란 요인은 시험 결과를 불확실하게 한다. 최근 분석은 이러한 요인이 고려되는 경우 thcy와 뇌졸중 위험 사이의 연관성이 일반 집단에서 강력함을 입증하였다(문헌참조: Spence JD, Clin Chem Lab Med. 2013 Mar 1;51(3):633-7, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 중요하게, 그러나, 일반 집단 보다 높은 tHcy 수준을 갖는 CBSDH 환자에서, Hcy 저하에 따른 혈관 이득은 지속적으로 입증되어 왔다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 1998; 21:738-747; Eslamiyeh *et al.* Iran J Child Neurol 2015; 9:53-57; Saboul *et al.* J Child Neurol 2015; 30:107-112; Yap *et al.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:2080-2085; Woods *et al.* BMJ Case Rep 2017;2017; Wilcken *et al.* J Inherit Metab Dis 1997; 20:295-300; Yap *et al.* Semin Thromb Hemost 2000; 26:335-340; Ruhoy *et al.* Pediatr Neurol 2014; 50:108-111, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0310] **[0261]** 이들 발견은 CBSDH가 있는 환자와 없는 환자에서 상승된 Hcy 수준이 CV 질환, 특히 뇌졸중의 위험 인자이며 장기간 Hcy 저하 치료요법을 통해 CV 또는 뇌혈관 위험을 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0311] **[0262]** 혈전 색전증은 CBSDH 환자의 이환율 및 조기 사망의 주요 원인이다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Yap S. J Inherit Metab Dis 2003; 26:259-265, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 치료받지 않은 CBSDH를 갖는 환자에서 혈전색전증 이벤트의 전체 비율은 대략 연간 10%이다(문헌참조: Cattaneo M. Semin Thromb Hemost 2006; 32:716-723, which is hereby incorporated by reference in its entirety), with risk increasing after surgery and during or immediately after pregnancy (see Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Novy *et al.* Thromb Haemost 2010; 103:871-873, 이의 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 혈전색전증은 모든 혈관에 영향을 미칠 수 있지만 CBSDH 환자에서 정맥 혈전증(특히 대뇌 동정맥 혈전증(CSVT))이 동맥 혈전증보다 더 흔하다(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31; Karaca *et al.* Gene 2014; 534:197-203; Eslamiyeh *et al.* Iran J Child Neurol 2015; 9:53-57; Saboul *et al.* J Child Neurol 2015; 30:107-112, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0312] **[0263]** 치료를 받지 않은 629명의 CBSDH 환자를 대상으로 한 연구는 관찰된 253명의 혈관 사건(환자 158명에서 발생) 중 81명(32%)이 대뇌혈관 질환이었고, 130명(51%)이 말초 정맥에 영향을 미쳤고(32명이 폐색전증 발병), 10명(4%)이 심근경색증(MI)으로 나타났고, 28명(11%)이 말초동맥에 영향을 받았고 4명(2%)이 이러한 카테고리 어디에도 속하지 않았다. 심혈관 사건, 특히 CSVT는 유아에서 보고되었지만(문헌참조: Mahale *et al.* J Pediatr Neurosci. 2017 Apr-Jun;12(2):206-207, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 보다 전형적으로는 젊은 성인에서 나타난다(문헌참조: 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 대뇌혈관 이벤트는 환자의 피리독신 반응 카테고리와 약간만 관련이 있는 것으로 보고되었다.

[0313] **[0264]** 혈관 이벤트의 위험은 20세>의 환자에서 대략 30%였으며 30세까지 50%로 증가한다. 그러나 증상은 임의의 연령에서 발생할 수 있고, 치명적인 혈전증은 생후 6개월의 유아에서 보고되었다(문헌참조: Cardo *et al.* Dev Med Child Neurol 1999; 41:132-135, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 10세 후, 하나의 혈관 이벤트가 25년 당 예상된다. 일반적으로, 어린이에서 CBSDH의 제1 징후는 정신 지체이고, 생후 1년 또는 2년 동안에

발달 지연, 및/또는 수정체 탈구/높은 근시로서 나타난다. 대조적으로, 성인은 혈관 이벤트가 나타날 가능성이 보다 높다.

[0314] **D. 표현형 결과에 대한 식이 요법의 효과**

[0315] **[0265]** 일부 구현예에서, HCU의 마우스 모델인 I278T 마우스를 사용하여 사람 환자와 관련된 임상 평가변수에 대한 20NHS PEG-CBS를 사용한 HCU에 대한 효소 치료요법의 장기간 영향을 평가하였다. 정상 메티오닌 섭취(REG) 및 Met 제한 식이(MRD) 및 MRD 단독의 배경에 대한 20NHS PEG-CBS의 효능. 20NHS PEG-CBS를 사용한 치료는 혈장 호모시스테인 농도를 90% 감소시키고 HCU와 관련된 학습/인지, 내피 기능부전, 지혈, 골 미네랄화 및 신체 조성 표현형을 보정할 수 있다. 특정 구현예에서, MRD의 배경하에 20NHS PEG-CBS를 사용한 치료는 혈장 Hcy를 정상화하였다. 단독의 MRD는 혈장 Hcy를 67%까지 감소시키고 I278T 마우스에서 HCU 표현형을 보정하는 것으로 관찰되었다. 그러나, MRD는 I287T 마우스 및 야생형 대조군에서 불안증을 증가시키고 골 미네랄 함량을 감소시켰다. 따라서 20NHS PEG-CBS는 REG 또는 Met 제한 식이 요법의 배경하에 대상체에서 HCU 치료에 매우 효과적이다. 사실, 정상 Met 섭취 배양하에 20NHS PEG-CBS를 사용한 ET는 Met-제한 식이 요법과 비교하여, 동등하게 수행하거나 보다 양호한 결과를 산출한다.

[0316] **E. 신경학적 합병증**

[0317] **[0266]** 연구는 낮은 Met 식이 요법, 엽산/B 비타민 보충 및/또는 피리독신 및 베타인 치료요법에 의해 유도된 Hcy 수준의 조기 감소가 다양한 신경학적 장애의 진행을 예방하고 때로는 역전시킬 수 있으며 CBSDH 환자의 정상적인 IQ 발달을 가능하게 한다(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015; 21:89-95; Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447; Mech AW, Farah A. Correlation of clinical response with homocysteine reduction during therapy with reduced B vitamins in patients with MDD who are positive for MTHFR C677T or A1298C polymorphism: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671; Grobe H. Eur J Pediatr 1980; 135:199-203; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH 환자의 사례 연구에서 추가의 입증이 제공되고, Hcy 수준의 정상화에도 불구하고 유의적인 감소는 CNS 결과의 완전한 또는 부분적인 보정을 유도하였다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447; Brenton *et al.* J Child Neurol 2014; 29:88-92; Rezazadeh *et al.* Child Neurol Open 2014; 1:2329048X14545870; Kaeser *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1969; 32:88-93; Colafrancesco *et al.* Eur J Pediatr 2015; 174:1263-1266; Yokoi *et al.* Pediatr Int 2008; 50:694-695; Li *et al.* Pathology 1999; 31:221-224, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0318] **[0267]** 정신 지체, 신경 퇴행성 질환, 발작, 근긴장 이상, 정신병, 인지 장애, 치매 및 우울증을 포함한 Hcy 및 CNS 증상의 상승된 수준 사이의 연관성은 CBSDH 환자 및 일반 집단에서 잘 문서화되어 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987; 26:959-969; Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327; Hidalgo *et al.* Eur Child Adolesc Psychiatry 2014; 23:235-238; Smith *et al.* PLoS One 2010;5: e12244; Seshadri *et al.* N Engl J Med 2002; 346:476-483; Bottiglieri *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69:228-232; Bjelland *et al.* Arch Gen Psychiatry 2003; 60:618-626; Tolmunen *et al.* Am J Clin Nutr 2004; 80:1574-1578; Kaeser *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1969; 32:88-93; Golimbet *et al.* Psychiatry Res 2009; 170:168-171; Clarke *et al.* Arch Neurol 1998; 55:1449-1455; Permoda-Osip *et al.* Neuropsychobiology 2014; 69:107-111; Oliveira *et al.* BMJ Case Rep 2016;2016; Troen *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:12474-12479; Sudduth *et al.* J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33:708-715; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Herrmann *et al.* Clin Chem Lab Med 2011; 49:435-441; Kim *et al.* J Nutr 2007; 137:2093-2097; Selhub *et al.* Am J Clin Nutr 2000; 71:614S-620S; McCaddon *et al.* Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12:309-313; Smallwood *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol 2012; 38:337-343; Beydoun *et al.* BMC Public Health 2014; 14:643; Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114; Health Quality O. Vitamin B12 and cognitive function: an evidence-based analysis. Ont.Health Technol.Assess.Ser.13 (23), 1e45. 2013. Ref Type: Online Source; Salagre *et al.* Eur Psychiatry 2017; 43:81-91, 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨). Hcy 수준이 상승된 개체에서 CNS 장애를 유도하는 기전은 tHcy 매개 신경 손상(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Stefanello *et al.*

Metab Brain Dis 2007; 22:172-182; Toborek *et al.* Atherosclerosis 1995; 115:217-224, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), Hcy-매개된 산화 스트레스에 의해 유발되는 혈관 내피에 대한 손상(문헌참조: Vivitsky *et al.* Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol 2004;287: R39-R46, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 뉴런 손실(문헌참조: Yeganeh *et al.* J Mol Neurosci 2013; 50:551-557; Heider *et al.* J Neural Transm Suppl 2004;1-13, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 약독화된 뉴런 네트워크 활성(문헌참조: Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)을 포함하는 것으로 사료된다. 우울증과 경련은 적어도 부분적으로 Hcy 매개된 대뇌 아데노신 수준의 감소와 그에 따른 노르에피네프린과 도파민의 수준의 감소에 의해 유발되는 것으로 사료된다(문헌참조: Mech *et al.* J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671; Domagala *et al.* Thromb Res 1997; 87:411-416; Vivitsky *et al.* Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol 2004;287: R39-R46; Folstein *et al.* Am J Psychiatry 2007; 164:861-867, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0319] **[0268]** 이러한 발견은 CBSDH 환자에서 Hcy 수준과 CNS 장애 위험 증가 사이에 강한 상관 관계가 있음을 입증하였다. 조기 Hcy-저하 치료요법은 조기 발병 CBSDH를 가진 어린이의 정상적인 발달과 이후에 CBSDH로 진단된 환자의 CNS 장애의 보정 또는 개선에 필수적이다.

[0320] **[0269]** 63명의 CBSDH 환자를 대상으로 한 연구는 51%가 불안 및 에피소드 우울증(10%), 만성 행동 장애(예를 들어, 공격성 및 약물 또는 알콜 남용)(17%), 만성 강박 장애(5%) 및 성격 장애 (19%)를 포함하는, 정신과적 장애를 가짐을 밝혔다(문헌참조: Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987; 26:959-969, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 정신병은 청소년기에 나타나는 징후일 수 있다(문헌참조: Hidalgo *et al.* Eur Child Adolesc Psychiatry 2014; 23:235-238, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0321] **[0270]** 치료받지 않은 경우, 피리독신 무반응 환자의 대략 90%는 학습 어려움을 갖고(문헌참조: Mudd *et al.* Am J Hum Genet 1985; 37:1-31, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), Iq는 전형적으로 10 내지 138이고, 피리독신 무반응 개체에서 평균 57이고, 이는 치료받지 않은 피리독신-반응 환자에서 79 및 양호한 순응도와 함께 치료받은 피리독신 반응 환자에서 105인 것과 대비된다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 발작은 12세까지 무반응 환자의 20%에 영향을 미치며 여러 사례에서 간대성 근경련, 근긴장 이상 및 파킨슨병을 포함하여 기저핵 경색과 관련이 없는 운동 장애가 보고되었다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Rezazadeh *et al.* Child Neurol Open 2014; 1:2329048X14545870, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0322] **[0271]** CBSDH와 신경정신과적 증상 간의 연관성은 최초로 1965년에 슘케 등(Schimke *et al.*)에 보고되었다(문헌참조: Schimke *et al.* JAMA 1965; 193:711-719, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 연관성은 이후에 50% 초과의 CBS-결핍 환자에서 정신병리학을 보고하는 연구에 의해 지지되었다(문헌참조: Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987; 26:959-969, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 그 이후로 수많은 역학 연구는 혈장 tHcy의 경미한 증가와 정신 지체 및 신경 퇴행성 질환을 포함한 CNS 장애의 위험 사이에 양성의 용량 의존적 관계가 있음을 보여주었다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Seshadri *et al.* N Engl J Med 2002; 346:476-483; Clarke *et al.* Arch Neurol 1998; 55:1449-1455; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Herrmann *et al.* Clin Chem Lab Med 2011; 49:435-441; Kim J *et al.* J Nutr 2007; 137:2093-2097; Selhub *et al.* Am J Clin Nutr 2000; 71:614S-620S; McCaddon *et al.* Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12:309-313; Smallwood *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol 2012; 38:337-343; Beydoun *et al.* BMC Public Health 2014; 14:643; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일반적으로 Hcy 수준이 상당히 상승된 환자(50 내지 200 μM/L)는 발작 및 정신병을 포함한 급성 신경 기능 장애를 나타내는 경향이 있는 반면, 보다 중등도의 Hcy 수준(15 내지 50 μM/L)은 인지 장애 및 치매와 관련되어 있다(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327; Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0323] **[0272]** 상승된 Hcy 수준은 광범위하게 인지 손상(문헌참조: Smith *et al.* PLoS One 2010;5: e12244; Seshadri *et al.* N Engl J Med 2002; 346:476-483, 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 치매의 개시(문헌참조: Health Quality O. Vitamin B12 and cognitive function: an evidence-based analysis. Ont.Health Technol.Assess.Ser.13 (23), 1e45. 2013. Ref Type: Online Source, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 알츠하이머 질환(문헌참조: Seshadri *et al.* N Engl J Med 2002; 346:476-483, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 대해 강하고 독립적인 위험 인자로서 받아들여지고 있다. 추가로 증가된 Hcy 수준(>15 μmol/L)은 우울

증을 가는 환자의 최대 90%에서 나타남을 보여주었고(문헌참조: Bottiglieri *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69:228-232; Bjelland *et al.* Arch Gen Psychiatry 2003; 60:618-626, 이 둘다는 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨), tHcy 수준에 대해 상위 3분위에서 남성은 최저 3분위에서의 남성 보다 우울증을 겪을 가능성이 2배 초과이다(문헌참조: Tolmunen *et al.* Am J Clin Nutr 2004; 80:1574-1578, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상승된 Hcy 수준은 통상적으로 정신분열증, 다발성 경화증, 파킨슨병, 섬유근육통/만성 피로 증후군(문헌참조: Kaeser et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1969; 32:88-93; Golimbet et al. Psychiatry Res 17009; :168-171; Clarke et al. Arch Neurol 1998; 55:1449-1455; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 뇌혈관 질환이 없는 재발성 근긴장이상(문헌참조: Sinclair et al. Mov Disord 2006; 21:1780 -1782, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)의 사례에서 보고된다. CBS 유전자의 T833C 다형성과 양극성 장애 사이의 가능한 연관성이 기재되었고(문헌참조: Permoda-Osip et al. Neuropsychobiology 2014; 69:107-111, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 최근 메타 분석은 양극성 질환이 있는 개체에서 상승된 Hcy 수준과 조증/정상기분 사이의 관계를 지적하였다(문헌참조: Salagre *et al.* Eur Psychiatry 2017; 43:81-91, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). CBSDH와 연관된 말초 신경병증의 첫번째 공지된 사례는 최근에 CBSDH를 갖는 18세 남성에서 보고되었고(문헌참조: Oliveira *et al.* BMJ Case Rep 2016;2016, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 정신병의 치명적인 사례가 CBSDH로 이전에 진단받지 않은 17세에서 보고되었다(문헌참조: Hidalgo *et al.* Eur Child Adolesc Psychiatry 2014; 23:235-238, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0324] **[0273]** Hcy 수준과 치매 사이의 관계에 대한 직접적인 증거는 Hcy 투여가 뇌 병변의 발달과 관련이 있다는 동물 연구로부터 유래한다(문헌참조: Troen *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:12474-12479; Sudduth *et al.* J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33:708-715, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이러한 첫 번째 상기 연구에서 Hcy 수준이 상승한 수컷 C57BL6/J 마우스(비타민 B 결핍 식이 요법에 의해 유도됨)은 공간 학습과 기억력을 크게 손상시켰으며 신경교증이나 신경변성이 수반되지 않는 해마 미세혈관 구조가 상당히 희박해졌다(문헌참조: Troen *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:12474-12479, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 총 해마 모세혈관 길이는 모리스 수중 미로 (Morris water maze) 탈출 잠복기($r = -0.757$, $p < 0.001$) 및 혈장 tHcy($r = -0.631$, $p < 0.007$)와 역 상관관계가 있었다. Met 풍부한 식이가 공급된 마우스는 유사하지만 덜 현저한 효과를 보여주었다. 이들 발견은 상승된 Hcy 수준이 신경변성이 없거나 선행하는 경우 인지 기능부전을 유도하는 대뇌 미세혈관 희박화와 관련이 있음을 시사하였다. 이것은 사람에서 상승된 Hcy 수준과 인지 감퇴 사이의 연관성을 설명할 수 있다.

[0325] **[0274]** 두 번째 연구에서 건강한 마우스에게 폴레이트, 비타민 $B_6$ 및 $B_{12}$가 결핍된 식이를 제공하고 Met를 보충하여 상승된 Hcy 수준을 적당히 유도하였다(혈장 tHcy 82.93±3.56 μmol/L). 이들 마우스는 2일 방사상 팔 수중 미로로 평가한 바와 같이 공간 기억력 결핍이 있었다(문헌참조: Sudduth *et al.* J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33:708-715, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). MRI 및 조직학은 유의적인 미세출혈율을 밝혔다. 대뇌 출혈의 발병기전에 연관된 2개의 효소인 MMP2 및 MMP9의 신경염증 및 증가된 발현 및 활성이 또한 관찰되었다. 이것은 알츠하이머 질환에서와 같이 상승된 Hcy 수준과 혈관 치매 간에 연관성을 시사하였다.

[0326] **[0275]** 사람에서, 백색질에서의 변화 (혈관 손상의 징후)는 흔히 CBSDH가 있는 개체 (문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015; 21:89-95; Vatanavicharn *et al.* J Inherit Metab Dis 2008;31 Suppl 3:477-481; Brenton *et al.* J Child Neurol 2014; 29:88-92; Ruhoy *et al.* Pediatr Neurol 2014; 50:108-111; 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨) 및 CBSDH가 없는 개체(문헌참조: Hogervorst *et al.* Arch Neurol 2002; 59:787-793; Kloppenborg *et al.* Neurology 2014; 82:777-783; 이의 각각은 이의 전문이 참조로 인용됨) 둘다에서 상승된 Hcy 수준과 연관된다. 그러나, 이들 변화는 항상 뇌졸중의 증거와 연관되어 있는 것은 아니다. 추가로, CBSDH 환자에서 뇌 이미지화 연구는흔히 위축증 또는 정맥 폐색의 징후를 보여준다(문헌참조: Vatanavicharn *et al.* J Inherit Metab Dis 2008;31 Suppl 3:477-481, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨).

[0327] **[0276]** 스캔은 대뇌 반구, 주로 정수리-후두부 영역(parieto-occipital region)에서 피질하 백질의 확산 대칭적 비정상적 증가 신호를 보여주고, 더 드문 정도로 보다 심층 백질의 신호를 밝힌다.

[0328] **1. 기전**

[0329] **[0277]** 상승된 Hcy 수준이 신경학적 건강에 영향을 미치는 정확한 기전은 알려져 있지 않다. 여러 동물 연구는 상승된 tHcy 수준과 신경 독성, 수반되는 신경 및 정신 손상 사이의 연관성을 보여주었다.

[0330] **[0278]** 초기 연구는 매우 높은 복막 내 용량의 Hcy가 운동 피질에 코발트 유도 병변이 있는 래트에서 전신 경련

성 간질 상태를 유도함을 보여주었다(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 발작은 Met와 비타민 B의 첨가로 증진되었으며, 시냅스 후 g-아미노부티르산 수용체를 차단하는 데 피리독살 5'-포스페이트와 Hcy의 상승 효과에 대한 일부 증거가 있다. 또한, 설치류 신피질 조직의 Hcy 처리는 AdoHcy 형태의 아데노신 포획을 유도하였다(문헌참조: Heinecke *et al.* J Biol Chem 1987; 262:10098-10103, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 저자들은 아데노신이 주로 대뇌 작용의 억제제이고, 경련 상태와 높은 수준의 Hcy와 연관된 정신적 변화가 대뇌 아데노신 수준의 감소에 의해 매개될 수 있다고 진술하였다.

[0331] **[0279]** Hcy는 뇌에서 신경독성과 형태적 변화와 연관되어 있다(문헌참조: Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 예를 들어, 래트와 토끼를 대상으로 한 연구는 산화 스트레스의 지표인 티오부티르산 반응성 물질(TBARS)의 Hcy 매개 증가로 인해 뉴런 손상이 발생함을 보여주었다. 혈장 TBARS에서 유사한 증가는 또한 경구 투여된 Met 부하 후 사람에서 관찰되었다(문헌참조: Domagala *et al.* Thromb Res 1997; 87:411-416, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 더욱이, 상승된 Hcy 수준에 대한 뮤린 모델의 연구는 CBSDH 환자에서 산화 스트레스로 인한 세포 손상이 증진될 수 있음을 시사하였는데, 그 이유는 감소된 Cys 수준이 글루타메이트, Cys 및 글라이신으로부터 합성된 중요한 항산화제인 뉴런 세포 글루타티온의 낮은 수준을 유도하기 때문이다(문헌참조: Vivitsky *et al.* Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol 2004;287: R39-R46, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0332] **[0280]** 래트 뇌의 좌심실로의 생체내 Hcy 주사는 용량-의존성 뉴런 상실을 생성하였고(문헌참조: Yeganeh *et al.* J Mol Neurosci 2013; 50:551-557, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 래트 기원의 뇌간막 뉴런의 Hcy로의 항온처리는 보다 적고 짧은 도파민성 신경돌기를 유도하였다(문헌참조: Heider *et al.* J Neural Transm Suppl 2004;1-13, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 연구 둘다에서 Hcy의 효과는 NMDA 및 대사성 글루타메이트 수용체의 길항제와 Hcy의 공동 투여에 의해 둔화되었으며, 이는 Hcy 유도 신경 손상에 대한 글루타메이트 수용체 매개 경로를 시사한다. 상기 경로에 대한 추가 증거는 Hcy 투여가 래트의 뇌 시냅토솜에서 용량- 의존적 지질 과산화를 유도한 연구로부터 유래한다(문헌참조: Jara-Prado *et al.* Neurotox Res 2003; 5:237-243, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일단 다시, 효과는 NMDA 수용체 또는 길항제의 투여에 의해 억제되었다.

[0333] **[0281]** 자발적 활성 배아 래트의 피질 뉴런에 대한 연구는 심각하게 상승된 Hcy의 범위를 초과하는 Hcy 수준이 신경망 활성의 용량 의존적 억제를 유발함을 보여주었다(문헌참조: Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 상기 연구에서 관찰된 효과는 CBSDH 환자에서 그러한 과장된 Hcy 수준에 결코 도달하지 않았기 때문에 임상적으로 관련이 없었다. 그러나 호모시스테인설핀산과 호모시스테인산(상승된 Hcy 수준을 갖는 환자에서 종종 발견되는 산화된 형태의 Hcy)의 약간의 상승은 유사한 효과를 나타냈다. 각각의 경우에, 신경망에 대한 손상은 2-아미노-5-포스포노발레르산에 의해 억제되었으며, 이는 다시 NMDA 수용체가 상기 Hcy 유도 뉴런 기능부전의 매개체임을 암시한다. 이들 결과는 상승된 Hcy 수준과 연관된 뉴런 기능부전이 Hcy 자체보다는 산화된 형태의 Hcy에 의해 유발될 가능성이 있음을 시사하였다.

[0334] **[0282]** 마르판 증후군 및 기타 결합 조직 장애 환자에서 정신 지체, 경련 및 기타 CNS 장애 부재는 CBSDH 환자의 신경학적 장애가 피브릴린 또는 콜라겐의 결함으로 인한 것이 아님을 시사한다(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327, 이의 전문이 참조로 인용됨). CBSDH를 치료하지 않은 환자에서, 상승된 수준의 SAM 및 감소된 수준의 SAH는 미엘린 합성에 필요한 트랜스메틸화 반응을 억제하여 추가 신경 손상을 유도한다(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 감소된 미엘린 합성은 또한 증가된 재메틸화 비율로 인해 CBSDH 환자에서 낮은 수준의 세린에 의해 유발될 수 있다(문헌참조: Orendac *et al.* J Inherit Metab Dis 2003; 26:761-773, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 마지막으로, Hcy 대사는 노르에피네프린과 도파민 생성을 위한 메틸기를 제공함으로써 모노아민 합성에 주요 역할을 수행한다(문헌참조: Mech *et al.* J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671; Folstein *et al.* Am J Psychiatry 2007; 164:861-867, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 실제로 "우울증의 호모시스테인 가설"(문헌참조: Folstein et al. Am J Psychiatry 2007; 164:861-867, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)은 상승된 Hcy 수준으로부터 비롯된 낮은 수준의 노르에피네프린 및 도파민이 우울증의 주요 원인임을 설명한다.

[0335] **[0283]** 래트 뇌 생검의 전자현미경은 8주 동안 높은 Hcy 식이를 공급받은 동물에서 뇌혈관 구조적 변경을 보여

주었다. 이들 변경은 높은 혈장 tHcy 수준과 연관되었다(문헌참조: Lee *et al.* J Nutr 2005; 135:544-548, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 추가 8주 동안 식이 엽산의 소비는 혈장 thcy을 정상 수준으로 감소시키고 손상된 혈관의 발생률을 유의적으로 감소시켰다. 이것은 엽산 보충을 사용한 Hcy 저하가 실험적으로 유도된 상승된 Hcy 수준의 혈관 내피에 대한 해로운 효과를 감소시킬 수 있음을 시사하였다.

[0336] **[0284]** 적어도 하나의 MTHFR 다형성(N = 330)으로 인해 주요 우울 장애(MDD) 및 CBSDH가 있는 성인을 대상으로 단일 치료요법으로서 환원된 비타민 B의 효능 및 안전성을 평가하도록 디자인된 연구는 환원된 비타민 B의 조합물이 131명의 치료받은 환자(82.4%)에서 tHcy 수준을 유의적으로 감소시킴을 밝혔고(상기 서브그룹의 평균 감소는 25%였고; p <0.001), 반면에, 위약 치료 환자는 tHcy 수준에서 작은 상승을 입증하였다(문헌참조: Mech *et al.* J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671, 이의 전문은 본원에 참조로 인용됨). 치료받은 환자는 평균적으로 8주차까지 Montgomery Asberg-우울증 등급 스케일(Depression Rating Scale)(MADRS)에서 12점 감소를 보였고 42%가 완전 관해에 도달하였다(p <0.001). 추가 임상 개선은 대다수의 응답자에서 tHcy 수준의 유의한 감소와 상관관계가 있었다. 이 연구는 CBSDH 환자를 대상으로 수행되지 않았지만, 우울증이 있는 개체에서 Hcy 저하에 대한 분명한 이득을 입증하여 '우울증의 Hcy 가설'을 뒷받침한다(문헌참조: Folstein *et al.* Am J Psychiatry 2007; 164:861-867, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0337] **[0285]** CBSDH와 관련된 정신과 증상이 있는 개체에서 Hcy 저하 치료요법의 이득은 늦게 진단된 12명의 환자에 대한 연구에서 처음으로 입증되었다(문헌참조: Grobe H. Eur J Pediatr 1980; 135:199-203, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이들 환자 중 3명은 결코 효과적으로 치료되지 않았고 조기 사망과 함께 중증의 심리적 장애를 가졌다. 나머지 8명의 환자는 1세에서 26세 범위(평균 13세)였으며 모두 과민성, ADHD, 무관심 및 정신병을 포함한 정신과적 증상을 보였다. 2 내지 9년 동안 피리독신을 사용한 치료 또는 보충 L-시스틴과 함께 낮은 Met 식이 요법을 사용한 치료는 생화학적 정상화와 상호 관련된 행동 및 지적 발달의 현저한 개선과 연관되었다. 저자들은 연구에서 관찰된 CBSDH 관련 후유증의 가역성과 개선 때문에 진단 당시의 연령과 이전 치료에 관계없이 모든 환자를 치료할 필요성을 강조하였다.

[0338] **[0286]** 아일랜드 스크리닝 프로그램으로부터 보다 최근 데이터를 사용하여 CBSDH(339 환자-년 치료)가 있는 피리독신 무반응 개체 23명의 정신 능력을 영향을 받지 않은 형제자매 대조군 10명의 정신 능력과 비교하였다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 동정된 23명의 환자들 중에서, 19명은 NBS를 통해 CBSDH로 진단되었고, 생후 조기 (생후 6주 이내)에 치료받았고, 2명은 후기에 (2.2세 및 2.9세) 검출되었고, 2명은 평가시에 치료받지 않았다. 모든 환자는 필요에 따라 비타민 $B_{12}$ 및 폴레이트 보충제와 함께, Met-부재, 시스테인-보충 합성 아미노산 혼합물로 치료를 받았다. 베타인은 지난 5년간 식이 요법에 잘 순응하지 않게 된 조기 치료 환자와 늦게 검출된 CBSDH 환자의 치료 보조제로 사용되었다.

[0339] **[0287]** 전반적으로, 초기 치료 그룹의 19명의 환자 중 13명(평균 연령 14.4세, 범위 4.4~24.9세)은 치료에 순응하였고(평생 혈장 fHcy 메디안 <11 μmol/L로 정의됨) 합병증을 갖고 있지 않은 반면, 잘 순응하지 않은 나머지 6명(평균 연령 19.9세, 범위 13.8 내지 25.5세)에서 합병증이 발병하였다. 평균 전체 스케일의 IQ(FIQ)는 순응 그룹에서 105.8(범위 84~120)이었고 반면, 순응이 좋지 않은 그룹에서는 80.8(범위 40~103)이었다. 평균 연령이 19.4세(범위 9.7~32.9세)인 대조군(n = 10)의 평균 FIQ는 102(범위 76~116)였다. 18.9 및 18.8세인 2명의 후기 검출된 환자는 각각 FIQ가 80 및 102인 반면, 22.4세 및 11.7세인 2명의 치료받지 않은 환자는 각각 FIQ가 52 및 53이었다. 순응하고 조기 치료를 받은 개체와 영향을 받지 않은 형제자매(대조군) 사이에는 유의미한 차이가 없었으며, FIQ는 영향을 받은 형제자매에서 유의적으도 보다 높았다(p=0.0397). 상대적으로 소수에도 불구하고, 이들 결과는 양호한 생화학적 대조군을 사용한 조기 치료가 정신 지체를 예방함을 시사한다.

[0340] **[0288]** 유사한 결과는 카타르에서 CBSDH의 32건 및 형제자매 대조군 25건의 신경 발달, 교육 및 인지 결과에 대해 보고한 사례 대조군 연구에서 수득하였다(문헌참조: El Bashir et al. JIMD Rep 2015; 21:89-95, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 연구에서 대상체의 평균 연령은 11.2세(0.6 내지 29 범위)이고, 56%는 남성이었다. 영향을 받지 않은 형제 자매와 비교하여 영향을 받은 개체는 총 IQ(특히 단기 기억, 양적 추론 및 시각적 공간 영역 측면에서)가 낮았고 상당수의 청소년 및 성인 사례에서 행동 및 정서적 문제뿐만 아니라 의학적 동반질환을 가졌다. 이들 중에서, CBSDH의 9개 사례 (28%)는 NBS에 의해 진단되었고 생후 첫번째 달에 치료받았다. 나머지는 생후 14개월에서 240개월 사이에 진단되었다. 치료 중 tHcy 및 Met 수준은 임상적으로 진단된 사람들보다 NBS를 통해 진단된 사람들에서 유의하게 더 양호하였고, 이는 능히 생후 조기에 식이 및 의약처방에 보다 잘 순응했기 때문이다. 조기 진단을 받은 환자와 임상 진단을 받은 환자 사이에서 IQ의 상당한 차이가 관찰되었다. 언어 영역의 차이, 특수 학교 출석 및 수업에서 추가 지원에 대한 접근은 그룹 간에 통계적으로 유의적이지

않았지만 '임상적으로 검출된' 그룹은 분명히 보고된 어려움이 더 많았다.

[0341] **[0289]** 여기에서 연구된 환자의 수는 작지만 출생 시 진단된 어린이와 토들러로 진단된 어린이 사이에는 현저한 차이가 있다. 임상적으로 진단된 그룹에서 115 μmol/L의 평균 tHcy 수준은 불량한 임상 결과 및 매우 낮은 IQ와 연관되었다.

[0342] **[0290]** CBSDH 환자의 정신병리에 대한 Hcy-저하 치료의 이득에 대한 추가 증거는 1963년 이후 병원(Boston Children's Hospital)에 내원한 모든 HCU 환자의 데이터에 대한 후향적 차트 검토에서 유래한다(엠. 알무크빌 등(M. Almuqbil, et al.)의 미공개 데이터 무료 제공). 전반적으로, HCU를 가진 19명의 환자가 동정되었고, 그 중 3명은 CBSDH 외에 메틸말론산혈증(심리적 결함과도 관련됨)이 혼동될 수 있기 때문에 분석에서 제외하였다. 나머지 16명의 환자 중 7명(CBSDH 6명, 코발라민(Cbl) 결핍 1명)은 초기 치료에 잘 순응하였다(4명은 식이 요법 단독, 2명은 식이 요법과 베타인 병용, 1명은 Cbl). 이 환자들 중 6명은 경미한 인지 결손 외에는 뚜렷한 정신과적 증상이 없었다. 대조적으로, 9명의 환자(피리독신 무반응 CBSDH가 있는 7명 및 CblG 결핍증이 있는 2명)는 치료 순응도가 좋지 않거나 가변적이었다(베타인 및 식이 요법에 2명, 식이 단독 요법에 1명, 비타민 B에 3명, 및 엽산 및 베타인에 2명). CBSDH 및 불량한 순응도를 가진 7명의 환자 모두는 우울증(n = 4), 편집증 경험(n = 2), 편집증 및 망상 정신병(n = 1), 불안 및 기분 조절불능(n = 1) 및 양호한 대사 조절로 개선되는 ADHD(n=1)를 포함한 정신과적 문제가 있었다. 2건의 CblG 사례는 현저하게 불안하거나 동요했다. 연령, 성별 및 인지 수준은 정신과적 영향을 받은 개체와 영향을 받지 않은 개체 간에 유의한 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 이들 결과는 양호한 대사 조절(Hcy 및/또는 Met 저하)이 CBSDH 환자에서 정신 및 행동 상태의 발병을 지연시키고 능히 예방할 가능성이 있음을 시사한다. 그러나 상기 연구는 불량하게 제어된 CBSDH가 정신병리로 이어지는지 또는 정신병리 자체와의 동반질환이 치료 결과에 대한 좋은 순응을 방해하는지 여부를 확인하지 않았다.

[0343] **[0291]** 정신 지체, 신경퇴행성 질환, 발작, 근긴장 이상, 정신병, 인지 장애, 치매 및 우울증을 포함한 Hcy 및 CNS 증상의 상승된 수준 간의 연관성은 CBSDH가 있거나 없는 개체에서 잘 문서화되어 있다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis 2017; 40:49-74; Abbott *et al.* Am J Med Genet 1987; 26:959-969; Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327; Hidalgo *et al.* Eur Child Adolesc Psychiatry 2014; 23:235-238; Schimke *et al.* JAMA 1965; 193:711-719; Smith *et al.* PLoS One 2010;5: e12244; Seshadri *et al.* N Engl J Med 2002; 346:476-483; Bottiglieri *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69:228-232; Bjelland *et al.* Arch Gen Psychiatry 2003; 60:618-626; Tolmunen *et al.* Am J Clin Nutr 2004; 80:1574-1578; Kaeser *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1969; 32:88-93; Golimbet *et al.* Psychiatry Res 2009; 170:168-171; Clarke *et al.* Arch Neurol 1998; 55:1449-1455; Sinclair *et al.* Mov Disord 2006; 21:1780-1782; Permoda-Osip *et al.* Neuropsychobiology 2014; 69:107-111; Oliveira *et al.* BMJ Case Rep 2016;2016; Troen *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105:12474-12479; Sudduth *et al.* J Cereb Blood Flow Metab 2013; 33:708-715; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Herrmann *et al.* Clin Chem Lab Med 2011; 49:435-441; Kim *et al.* J Nutr 2007; 137:2093-2097; Selhub *et al.* Am J Clin Nutr 2000; 71:614S-620S; McCaddon *et al.* Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12:309-313; Smallwood *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol 2012; 38:337-343; Beydoun *et al.* BMC Public Health 2014; 14:643; Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114; Health Quality O. Vitamin B12 and cognitive function: an evidence-based analysis. Ont.Health Technol.Assess.Ser.13 (23), 1e45. 2013. Ref Type: Online Source; Salagre *et al.* Eur Psychiatry 2017; 43:81-91, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).Hcy 수준이 상승된 개체에서 CNS 장애를 유도하는 기전은 tHcy 매개 신경 손상(문헌참조: Mudd *et al.* Disorders of transsulfuration. In: Scriver CL, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2001;1279-1327; Hainsworth *et al.* Biochim Biophys Acta 2016; 1862:1008-1017; Stefanello *et al.* Metab Brain Dis 2007; 22:172-182; Toborek *et al.* Atherosclerosis 1995; 115:217-224, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), Hcy-매개된 산화 스트레스에 의해 유발되는 혈관 내피에 대한 손상(문헌참조: Vivitsky *et al.* Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol 2004;287: R39-R46, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), 뉴런 손실(문헌참조: Yeganeh *et al.* J Mol Neurosci 2013; 50:551-557; Heider *et al.* J Neural Transm Suppl 2004;1-13, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 약독화된 뉴런 네트워크 활성(문헌참조: Gortz *et al.* J Neurol Sci 2004; 218:109-114, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)을 포함하는 것으로 사료된다. 우울증과 경련은 적어도 부분적으로 Hcy 매개된 대뇌 아데노신 수준의 감소와 그에 따른 노르에피네프린과 도파민의 수준의 감소에 의해 유발되는 것으로 사료된다(문헌참조: Mech *et al.* J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671; Domagala *et al.*

Thromb Res 1997; 87:411-416; Vivitsky *et al.* Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol 2004;287: R39-R46; Folstein *et al.* Am J Psychiatry 2007; 164:861-867, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0344] **[0292]** CBSDH에 대한 동물 모델 (문헌참조: Lee *et al.* J Nutr 2005; 135:544-548, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 CBSDH가 있는 환자(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD Rep 2015; 21:89-95; Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447; Mech *et al.* J Clin Psychiatry 2016; 77:668-671; Grobe H. Eur J Pediatr 1980; 135:199-203, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 둘다에서 수많은 연구는 낮은 Met 식이, 엽산/비타민 B 보충 및/또는 피리독신/베타인 치료요법에 의해 유도된 Hcy 수준에서의 조기 감소가 다양한 신경 장애를 예방하고, 때로는 이의 진행을 역전시킬 수 있음을 보여주었다. CBSDH 환자의 6개 연속 사례 연구에서 추가의 입증이 제공되고, Hcy 수준의 정상화에도 불구하고 유의적인 감소는 CNS 결과의 완전한 또는 부분적인 보정을 유도하였다(문헌참조: Yap *et al.* J Inherit Metab Dis 2001; 24:437-447; Brenton *et al.* J Child Neurol 2014; 29:88-92; Rezazadeh *et al.* Child Neurol Open 2014; 1:2329048X14545870; Kaeser *et al.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1969; 32:88-93; Colafrancesco *et al.* Eur J Pediatr 2015; 174:1263-1266; Yokoi *et al.* Pediatr Int 2008; 50:694-695; Li *et al.* Pathology 1999; 31:221-224, 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0345] **[0293]** 이들 발견은 CBSDH 환자 및 일반 집단에서 Hcy 수준과 CNS 장애 위험 증가 사이의 강한 상관 관계를 입증한다. 조기 Hcy-저하 치료요법은 조기 발병 CBSDH를 가진 어린이의 정상적인 발달과 이후에 CBSDH로 진단된 환자의 CNS 장애의 보정 또는 개선에 필수적이다.

[0346] IX. 정의

[0347] **[0294]** 본원 명세서에 사용된 바와 같은, 단수형(“a,” “an” 및 “the”)는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수형의 해당 대상물을 포함한다.

[0348] **[0295]** 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한 및 하한과 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 값 또는 중간 값 사이의 각각의 중간 값이 본 개시 내용 내에 포함되고 구체적으로 기재되는 것으로 의도된다. 예를 들어, 1 μm 내지 8 μm의 범위가 명시되면 2 μm, 3 μm, 4 μm, 5 μm, 6 μm, 7 μm도 명백하게 기재된 것이고, 1μm 이상의 값의 범위 및 8μm 이하의 값 범위도 기재된 것이다.

[0349] **[0296]** 본원에 사용된 "동시-투여된" 또는 "동시-투여"는 약제학적 조성물을 포함하는 2개 이상의 치료 성분의 투여를 의미한다.

[0350] **[0297]** 본원에서 사용된 바와 같은 “약물 생성물”은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 페길화된 사람 절단된 CBS 단백질 (예를 들어, 20NHS PEG-CBS)의 약물을 포함하는 유닛 형태의 약제학적 조성물을 언급한다.

[0351] **[0298]** 본원에서 사용된 바와 같은 “약물”은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 페길화된 사람 절단된 CBS 단백질 (예를 들어, 20NHS PEG-CBS)을 언급한다.

[0352] **[0299]** 본원에 사용된 바와 같은 “음성 임상 결과”는 질환, 장애 또는 병태로부터 비롯된 바람직할 수 없는 표현형 결과를 언급한다.

[0353] **[0300]** 본원에 사용된 바와 같은 "재조합체"는 예를 들어 세포, 핵산, 폴리펩타이드, 발현 카세트 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 물질 또는 새로운 모이어티의 도입 또는 기존 모이어티의 변경에 의해 변형되거나, 이와 동일하지만 합성 물질로부터 유래된 천연 또는 고유 형태의 물질에 상응하는 물질을 언급한다. 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 고유(비재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자(즉, "외인성 핵산")를 발현하거나 그렇지 않으면 다른 수준으로 발현되는 고유 유전자를 발현하거나, 하향 발현하거나 전혀 발현되지 않는다.

[0354] **[0301]** 재조합 기술은 예를 들어, 발현 벡터와 같은 발현 시스템으로의 삽입을 위한, 단백질 또는 안티센스 서열을 암호화하는 cDNA와 같은 재조합 핵산의 사용을 포함할 수 있고; 생성된 작제물은 세포 내로 도입되고, 세포는 적절한 경우 핵산 및 단백질을 발현한다. 재조합 기술은 또한 융합 단백질의 발현, 단백질의 항시성 발현, 또는 단백질의 유도성 발현을 위한 하나의 발현 카세트 또는 벡터로의 상이한 공급원으로부터의 암호화 또는 프로모터 서열로 핵산의 연결을 포함한다.

[0355] **[0302]** 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 척추동물, 바람직하게는 포유류를 언급한다. 포유류는 사람을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0356] **[0303]** 본원에 사용된 "연관된"은 질병, 병태 또는 표현형의 발달 또는 발현과의 일치를 의미한다. 연관은 특정

질환, 병태 또는 표현형에 관여하는 경로의 일부인 것들 및 질환, 병태 또는 표현형의 증상에 간접적으로 기여하는 것들로서 다양한 질환 및 병태의 기초를 제공할 수 있는 하우스키핑 기능에 관여하는 유전자로 인한 것일 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0357] **[0304]** 본원에 사용된 바와 같은 “약제학적으로 허용되는 부형제” 또는 “약제학적으로 허용되는 담체”는 임의로 본원 개시내용의 조성물에 포함될 수 있고 환자에게 어떠한 유의적인 부작용의 독성학적 효과를 유발하지 않는 본원에 개시내용의 조성물에 포함될 수 있는 부형제를 언급한다. 특히, 현재의 경우에, 이는 활성 화합물(여기서는 페길화된 htCBS 또는 "20NHS PEG-CBS")과 함께 포유동물 대상체의 신체에 흡수될 수 있고 대상체에 심각한 유해한 독성 효과가 없는 부형제를 언급한다.

[0358] **[0305]** 본원에 사용된 용어 "보조제", "희석제" 또는 "담체"는 치료제의 전달을 위한 담체로 사용되며 대상체, 예를 들어, 대상체에 투여하기에 적합한, 그 자체가 치료제가 아닌 임의의 물질로서 포유류 또는 약제학적 조성물에 첨가되어 취급 또는 저장 성질을 개선하거나 조성물의 용량 단위를 경구 투여에 적합한 캡슐 또는 정제와 같은 개별 물품으로의 형성을 가능하게 하거나 촉진시키는 물질을 의미할 수 있다. 용어 "보조제", "희석제" 또는 "담체"는 "약제학적으로 허용되는 부형제", "비히클", "용매" 등을 포함하는 "부형제"를 포함하며, 이러한 용어는 본 명세서에서 사용되는 바와 같다. 부형제 및 비히클은 당해 기술분야에 공지된 임의의 그러한 물질, 예를 들어, 임의의 액체, 겔, 용매, 액체 희석제, 가용화제 등을 포함하며, 이는 비독성이고 유해한 방식으로 조성물의 다른 성분과 상호작용하지 않는다. 방법. 투여는 경구 투여, 흡입, 장 투여, 영양공급 또는 정맥 주사에 의한 접종을 의미할 수 있다. 부형제는 표준 약제학적 성분을 포함할 수 있고 또한 사람 및/또는 동물 소비, 사료공급 또는 미끼 제형 또는 다른 식재료를 위한 식품 및 음료를 제조하기 위해 사용될 수 있는 임의의 성분들을 포함할 수 있다.

[0359] **[0306]** 본원에 사용된 바와 같은 “약물” 또는 “약리학적 활성제” 또는 임의의 다른 유사 용어는 당업계에 이전에 공지된 방법에 의한 및/또는 본원 개시내용에 교시된 방법에 의한 투여용으로 적합한, 펩타이드를 포괄하는 임의의 화학적 또는 생물학적 물질을 의미하고, 이러한 물질은 목적하는 생물학적 또는 생리학적 효과를 유도하고, 이는 (1) 유기체에 대해 예방적 효과를 갖고 감염을 예방하는 것과 같은 목적하지 않은 생물학적 효과를 예방하고/하거나 (2) 질환에 의해 유발된 병태를 완화시키고, 예를 들어, 질환의 결과로서 유발된 통증 또는 염증을 완화시키고/시키거나 (3) 상기 질환을 유기체로부터 완화시키거나, 감소시키거나 완전히 제거하는 것을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 상기 효과는 국소 마취 효과를 제공하는 것과 같은 국소적일 수 있거나 이것은 전신성일 수 있다. 본원 개시내용은 신규 침투제 또는 신규 부류의 활성제에 관한 것이 아니다. 오히려 이것은 당업계에 존재하거나 이후에 활성제로서 확립될 수 있고 본원 개시내용에 의한 전달을 위해 적합한 제제 또는 침투제의 전달 방식으로 제한된다.

[0360] **[0307]** 본원에 사용된 바와 같이, 특히 소정의 양과 관련하여 용어 "약"은 ±5%의 편차를 포함하는 것을 의미한다.

[0361] **[0308]** 본원의 조성물과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약리학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 비-독성이고 치료될 대상체에서 혈류 또는 작용 부위 (예를 들어, 세포 내)에서 목적하는 수준을 제공하고/하거나 호모시스틴요증의 증상의 개선과 같은 목적하는 생리학적, 생물리학적, 생화학적, 약리학적 또는 치료학적 반응을 제공하기에 충분한 양의 활성제 (활성제를 함유하는 조성물)를 언급한다. 요구되는 정확한 양은 대상체마다 다양하며, 활성제, 조성물의 활성, 사용된 전달 장치, 조성물의 물리적 특징, 의도된 환자 용도(즉, 하루당 투여되는 투여 횟수) 환자 고려사항, 예를 들어, 종, 연령 및 대상체의 일반적인 병태, 치료되는 병태의 중증도, 대상체가 복용하는 추가 약물, 투여 방식 등과 같은 환자 고려 사항뿐만 아니라 1일 투여되는 용량과 같은 많은 인자에 의존한다. 이들 요인 및 고려 사항은 여기에 제공된 정보를 기반으로 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 임의의 개별 경우에 적절한 "유효"량은 본원에 제공된 정보에 기초하여 일상적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0362] **[0309]** 본원에 사용된 바와 같은 용어 “핵산”은 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있으며, 전령 RNA, 합성 RNA 및 DNA, cDNA 및 게놈 DNA를 포함한다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 단일 가닥이면 암호화 가닥 또는 비암호화(안티센스, 상보적) 가닥일 수 있습니다.

[0363] **[0310]** 본원에 사용된 바와 같은 "돌연변이체"는 글리코실화, 단백질 안정화 및/또는 리간드 결합과 관련된 성질 또는 기능을 변경하도록 디자인되거나 가공된 돌연변이된 단백질이다.

[0364] **[0311]** 본원에 사용된 바와 같이, 소정의 세포, 폴리펩타이드, 핵산, 형질 또는 표현형과 관련된 "고유형" 또는

"야생형"이라는 용어는 천연에서 전형적으로 발견되는 형태를 지칭한다.

[0365] **[0312]** 본원에 사용된 용어 "단백질", "폴리펩타이드", "올리고펩타이드" 및 "펩타이드"는 그들의 통상적인 의미를 가지며 길이 또는 해독 후 변형(예를 들어, 글리코실화, 인산화, 지질화, 미리스틸화, 유비퀴틴화 등)과 상관 없이 아미드 결합에 의해 공유 연결된 적어도 2개의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 추가로, 본원에 기재된 폴리펩타이드는 특정 길이로 제한되지 않는다. 상기 정의에 포함되는 것은 D- 및 L-아미노산, 및 D- 및 L-아미노산의 혼합물이다. 상기 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등, 뿐만 아니라 천연 발생 및 비-천연 발생 모두에서 당업계에 공지된 다른 변형을 언급하지 않거나 배제하지 않는다. 폴리펩타이드는 전체 단백질 또는 이의 서브서열일 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 에피토프, 즉, 폴리펩타이드의 면역원성 성질에 실질적으로 관여하고 면역 반응을 유발할 수 있는 항원성 결정인자를 포함하는 아미노산 서브서열을 언급할 수 있다.

[0366] **[0313]** 본원에 사용된 바와 같은 "에 상응하는 위치" 등은 또 다른 참조 핵산 분자 또는 단백질에서의 위치에 상대적인 핵산 분자 또는 단백질에서의 관심 위치(즉, 염기 번호 또는 잔기 번호)를 지칭한다. 상응하는 위치는 예를 들어, 서열 간의 동일성이 90% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99%초과이도록 뉴클레오타이드 또는 잔기를 일치하는 수를 최대화하기 위해 서열을 비교하고 정렬함에 의해 결정될 수 있다. 관심 대상의 위치는 이어서 참조 핵산 분자에 할당된 번호가 주어진다. 예를 들어, Gene-X의 특정 다형성이 서열번호 X의 뉴클레오타이드 2073에서 존재하는 경우, 또 다른 대립유전자에서 상응하는 뉴클레오타이드를 동정하거나 단리하기 위해 상기 서열을 정렬한 다음 2073과 일치하는 위치를 동정한다. 다양한 대립유전자의 길이가 다를 수 있으므로 2073을 지정하는 위치는 뉴클레오티드 2073이 아닐수 있고 대신 참조 서열 내 위치에 "상응하는" 위치에 있다.

[0367] **[0314]** 본원에 사용된 용어 "장기 투여"는 6주 이상의 기간에 걸쳐 PEG 모이어티에 접합된 CBS 효소, htCBS, 또는 htCBS 돌연변이체(예를 들어, C15S 돌연변이를 가짐)의 투여를 지칭한다.

[0368] **[0315]** 본원에 사용된 용어 "연속 투여"는 피하 주사 또는 이식된 삼투압 펌프를 통한 연구 과정 전체에 걸쳐 PEG 모이어티에 접합된 CBS 효소, htCBS 또는 htCBS 돌연변이체(예를 들어, C15S 돌연변이를 갖는)의 반복 투여를 지칭한다.

[0369] **[0316]** 시스테인의 아미노산 위치 15에서 세린으로 돌연변이가 있는 페길화된 사람 절단된 CBS 단백질을 포함하는 본원에 기재된 약물 생성물로 효소 요법(ET)을 통해 호모시스틴뇨증을 치료하는 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0370] **[0317]** 본 개시내용의 하나 이상의 구현예의 세부사항은 아래의 첨부된 기재사항에 제시되어 있다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 균등한 임의의 방법과 물질들을 본원 개시내용의 실시 또는 시험에 사용할 수 있으나, 바람직한 방법과 물질들을 이제 기술할 것이다. 본원 개시내용의 다른 특성, 목적 및 이점은 하기의 기재 사항으로부터 자명할 것이다. 상기 기재사항에서, 단수 형태는 또한 달리 명백하게 명시되지 않는 경우 복수를 포함한다. 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 모순이 있는 경우, 본원의 개시내용이 우선한다.

[0371] **[0318]** 본원의 개시내용은 하기의 비제한적인 실시예에 의해 추가로 예시된다.

[0372] **실시예**

[0373] **실시예 1. 실험 프로토콜**

[0374] **A. 발효**

[0375] **[0319]** 절단된 사람 CBS를 암호화하는 서열을 함유하는 발현 벡터로 Bl-21(DE3) 이. 콜리(*E. coli*) 세균을 형질전환시키고, 카나마이신 내성 클론으로부터의 세균을 30㎍/mL의 가나마이신을 갖는 5ml의 루리아-버타니(Luria-Bertani)(LB) 배지에서 275rpm의 회전식 진탕기에서 37℃에서 밤새 성장시켰다. 1mL의 밤새 배양물을 30㎍/mL의 가나마이신을 갖는 100mL 테리픽 브로쓰(Terrific Broth) (TB) 배지에 첨가하고 밤새 성장시켰다. 이어서 10ml의 예비 배양물을 0.001%의 티아민-HCl pH 8.0, 0.0025%의 피리독신-HCl pH 8.0, 0.3mM의 δ-ALA pH 8.0, 150 μM의 염화제2철, 30μg/mL의 가나마이신을 함유하는 1리터의 TB 배지에 첨가하였다. 이어서, 배양물을 OD600이 약 0.6-0.7의 값에 도달할 때까지 275rpm에서 회전식 진탕기 상에서 30℃에서 성장시키고 1mM의 IPTG의 첨가에 의해 단백질 발현을 유도하였다. 발효는 추가로 16시간 동안 계속하였다. 세포를 4℃에서 6000 상대 원심력(rcf) 원심분리의 10분에 의해 수거하고, 빙냉 0.9% NaCl로 세척하고, 상기와 같이 재원심분리하고, -80℃에서

동결시켰다. 이어서, 용해 완충액(20mM $NaH_2PO_4$, pH 7.2, 40mM NaCl, 0.1mM PLP)을 세포 펠렛에 첨가하였고, 후자를 다운스(Dounce) 균질화기에서 균질화하고 리소자임(2mg/mL 최종)으로 처리하고, 흔들리는 플랫폼 상에서 4°에서 1시간 동안 항온처리하고, 초음파 처리하여 점도를 감소시키고 53,000 rcf에서 원심분리하였다. 이어서 가용성 분획을 포함하는 상등액을 -80℃에서 저장하였다.

[0376] **[0320]** 최적화 및 스케일-업 계획은 고수준의 CBS 발현을 위한 발효 공정, 5-아미노레불린산(ALA), 티아민(비타민 B1), 피리독신 HCl 및/또는 염화 제2철과 같은 배지 보충물의 양 및 첨가 프로필, C 공급원 및 이의 개시 및 공급 조건, 온도, pH 및 유도 조건(유도제 농도 및 유도 기간의 길이)을 확립하기 위해 디자인하였다.

[0377] **[0321]** 30℃에서 24시간의 유도 기간 동안 총 0.05g/L B6 및 0.5g/L ALA가 보충된 최소 염 배지(C-공급원: 글리세롤)로 가장 높은 세포 밀도와 최상의 발현 수준을 달성하였다.

[0378] **[0322]** 발효 말기(EOF)에서 대략 110±10의 600nm(OD600)에서의 세포 밀도가 달성되었고, 이는 대략 90±10g/L의 습윤 중량에 상응하였다. 발효 공정의 CBS 역가는 방사성 및 비색 활성 분석에 의해 결정된 바와 같이 대략 2.5-3.0g의 CBS/L이었다.

[0379] **B. 정제**

[0380] **[0323]** 세포 용해물로부터 정제된 효소에 대한 전체 효소 활성 회수 목표는 적어도 3개의 크로마토그래피 단계가 필요할 것이라고 가정할 때 30%였다. 개발된 공정은 60 mL 포획 컬럼의 스케일에서 평가하였다.

[0381] **1. 포획 단계**

[0382] **[0324]** 음이온 교환 크로마토그래피 (AEX)는 재조합 CBS의 생성에서 제1 포획 단계로서 사용하였다. 이어서, 거의 중성 pH에서 DEAE-세파로스 수지에 포획한 다음 $KH_2PO_4$의 선형 농도구배를 통한 추가 정제를 위해 용출액을 연마하였다. DEAE-세파로스는 약한 교환기이고 이는 시스템의 전하가 주변 pH에 의존함을 의미한다. 이에 의해, pH는 수지의 역학적 결합 능력 (DBC)과의 관계가 밀접하다. 결합 pH를 6.4로 저하시키는 것은 포획 단계의 수행능을 감소시키지 않았다. 세포 페이스트에 대한 희석이 가용화를 위해 5용적의 붕괴 완충액을 사용한 경우 부하 시간은 약 30분이었다.

[0383] **[0325]** 세척은 7g/L CBS(이는 L 수지당 대략 35g 총 단백질의 DBC에 해당)의 결정된 최대치에 근접한 부하 용량으로 10개 컬럼 용적에 대해 수행하였다. 120mM NaCl의 존재하에 16mS/cm의 용출 전도도 조건하에서 용출을 수행하였다.

[0384] **[0326]** 세포 추출물이 좁은 시간 프레임 내에 부하되는 한 회수율은 약 90%로 관찰되었다. 세포 추출물 내에 CBS 역가에 의존하여, 대략 3.5의 정제 인자는 상기 포획 단계에 의해 도달하였다.

[0385] **2. 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)**

[0386] **[0327]** 아연(Zn) 이온을 사용하는 $Co^{2+}$ 고정화된 금속 친화성 크로마토그래피로서 언급되는 IMAC는 숙주 세포 단백질(HCP)로부터 CBS의 직교 분리를 위해 결합 선택성을 사용한다. 약 2.5의 정제 인자가 관찰되었다.

[0387] **[0328]** 상기 용출 단계는 CBS 분획을 탈염시키는 것과 조합하여 11mM 이미다졸을 포함하였다. 염화나트륨 농도는 용출 완충액 내부에서 400mM(부하/세척)에서 50mM로 저하되었다. 이는 전도도가 용출 거동 자체에 큰 영향을 미친다는 소규모 스크리닝에서 나타날 수 있다. 예를 들어, 이미다졸 없이 정제수에 의해서만 CBS를 용출시킬 수 있었다. 용출 완충액 내부에서 염화나트륨의 양을 증가시켜 CBS의 안정성을 증가시켰다. 150mM 염화나트륨에서 용출 거동은 약간만 변화되었다.

[0388] **[0329]** 완충 시스템으로서 HEPES를 사용하면 12-15g/L의 DBC를 측정할 수 있다. 또한, 샘플의 안정성은 침전에 대해 증가할 뿐만 아니라 분해가 감소하였다. EDTA를 첨가함으로써 현재 사용되는 포스페이트 완충 시스템과 달리 HEPES 완충액을 사용함에 의해 분해를 중단시켰다. 스케일-업에서 EDTA와 황산 암모늄은 분해를 억제해야 하는 용출이 완료된 직후에 부가되었다. 추가로, 이 상태에서 항온처리 시간을 짧게 유지하기 위해 다음 연마를 가능한 한 빨리 수행하였다. IMAC 용출 풀은 연마를 위해 3시간 이내에 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC) 컬럼상에 부하하였다.

[0389] **3. 연마 단계**

[0390] **[0330]** CBS 정제 트레인의 최종 크로마토그래피 단계에서 분리는 소수성 상호작용을 기반으로 하였다. 주요 컬럼은 용출 조건의 차이에 의해 대부분의 HCP로부터 관심대상의 단백질인 CBS를 분리하였다. 대부분의 HCP는 CBS

보다 HIC에 더 강하게 결합하며, 이는 CBS가 나머지 HCP의 대부분보다 덜 소수성임을 지적한다.

[0391] **[0331]** IMAC와 비교하여, HIC는 낮은 결합 분리 (10% 미만)를 갖는다. 90% 초과의 나머지 HCP 불순물은 용출 단계에 의해 HIC로부터 분리하였다. HIC의 CBS 회수는 약 95%였다. DBC는 약 16g/L 내지 약 18g/L였다. 상기 연마 단계의 수행능은 매우 강하였다. 용출 단계에 대한 pH는 6 내지 8이었다. 완충 시스템(포스페이트 또는 20mM HEPES)은 측정 가능한 영향이 없었다.

[0392] **[0332]** 상기 연마 단계의 정제 인자는 최종 크로마토그래피 단계에 전형적인 부하 내부에 낮게 남아 있는 HCP 함량으로 인해 약 1.1이었다. 수행된 모든 다운스트림 생산 공정 사이의 최종 CBS의 순도는 유사하게 높았으며, 이는 상기 연마 단계가 부하 내부의 다양한 정도의 불순물을 보상했음을 지적한다.

[0393] **[0333]** 공정 단계를 기존 장비에 맞게 조정하고 나중에 생산을 위해 발효 용적을 100L까지 스케일-업할 수 있게 조정이 수행될 수 있다. 신뢰할 수 있는 제품 품질을 보장하기 위해 EDTA(예를 들어, 10mM)를 여러 공정 단계에 추가하여 메탈로프로테아제로 인한 제품 분해를 방지할 수 있다.

[0394] **C. 페길화**

[0395] **[0334]** 페길화 반응은 생성물-유도된 억제와 함께 2차 반응 처럼 거동하였다. NHS-PEG에서의 가수분해는 반응 억제의 이유가 될 수 없고 4시간의 페길화 후에 최종 페길화 패턴에 도달했기 때문에 나머지(약 50%) NHS-PEG는 여전히 활성인 것으로 관찰되었다. 흥미롭게도, 반응 혼합물에 NHS-PEG를 추가하면 페길화 패턴을 증가시켰다. CBS 농도는 DMSO의 부재 하에 NHS-PEG 대 CBS 비율을 증가시키지 않으면서 목적하는 페길화 패턴을 수득하기 위해 반응 혼합물 내부에서 8 g/L이었다.

[0396] **D. 데이터 및 통계 분석**

[0397] **[0335]** 표 4는 본원의 실시예에서 데이터 분석을 위해 사용되는 소프트웨어, 분석학적 도구 및 알고리즘에 대한 세부사항을 제공한다.

[0398] [표 4]

**프로그램 및 통계 분석**

[0399]

| | |
|---|---|
| 크로마토그램 획득 및 크로마토그래피 피크 통합 | AB Sciex ANALYST™ 1.6 소프트웨어 |
| 표준 회귀, 농도 계산, 데이터 관리 | Thermo Scientific Watson LIMS™ |
| Watson LIMS 와 데이터 시스템 사이의 계면 | 텍스트 파일 |
| SS 및 WS 대조군에 대한 계산 | 마이크로소프트 엑셀 |
| 회귀 모델 | 선형 |
| 가중 인자 | 1/x2 |
| 농도 제공 | 3 개의 유의적 수치 |
| 농도 유닛 | μmol/L 또는 μM 의 등가 매트릭스 |
| 보고된 요약 통계 | 평균, SD, %DEV, %CV |
| %DEV 및 %CV 의 소수 자릿수 | 2 |

[0400] **[0336]** 분석가는 모든 크로마토그램을 검토하여 크로마토그래피 피크 모양과 피크 통합이 만족스러운지 확인하였다. 수동으로 전송된 데이터는 연구 미가공 데이터의 일부인 소스 데이터와 교차 확인되었다. 수행 허용 기준은 보정 표준, QC 및 블랭크 QC로부터의 결과를 기반으로 분석 전에 설정되었다. 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차(SEM)로 제공된다.

[0401] **[0337]** 통계 분석은 ANOVA를 사용한 후 터키(Tukey)의 다중 비교 시험에 의해 수행하여 유의성을 결정하였다.

[0402] **E. 방사성표지된 Ser의 전환을 기준으로 하는 CBS 활성 검정**

[0403] **[0338]** CBS는 세린(Ser)이 피리독살 5'-포스페이트(PLP) 의존적 방식으로 Hcy와 응축되어 Cth를 형성하는 β-대체 반응을 촉매한다. CBS 효소의 활성은 14C로 표지된 Ser을 기질로 사용하는 방사성동위원소 분석에 의해 결정되었다.

[0404] [0339] $^{14}$C-L-Ser + L-Hcy → $^{14}$C-L-Cth + $H_2O$

[0405] **[0340]** 희석 완충액(1mM DTT, 10μM PLP 및 0.5mg/ml 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 pH 8.6의 0.1M Tris-

HCl) 중 7㎕(총 420ng) 순수 20NHS PEG-CBS의 분취량 또는 7㎕ 혈장(D25 및 D27 샘플에 희석 필요 없음)을 88㎕ 반응 혼합물(10mM L-Ser, 0.5mM PLP, 0.5mg/ml BSA 및 0.3㎕Ci L-[14C(U)]-Ser)에 첨가하였다. 샘플을 수조에서 5분 동안 항온처리하여 37℃로 평형화하였다. 반응을 5 ㎕ 0.2 M Hcy(최종 농도 10 mM)로 개시하고 37℃에서 추가로 30분 동안 항온처리하였다.

[0406] **[0341]** 각각의 반응 시간이 정확히 30분이 되도록 검정 개시 및 생성된 혼합물의 샘플링은 시차를 두었다. 하강(Descending) 종이 크로마토그래피를 사용하여 표지된 기질(Ser)로부터 방사성 생성물(Cth)을 분리하였다. 반응을 중단하기 위해 분석 혼합물을 방욕조에서 냉각하고 20㎕의 분취량을 3등급 CHR 크로마토그래피 종이(Whatman, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)상에 피펫팅하여 분리하였다. 반응에서 형성된 14C-Cth를 2-프로판올:포름산:H2O(75:5.7:18.9 v/v)로 밤새 용출시켜 14C-Ser로부터 분리하였다. Cth 및 Ser의 혼합물을 함유하는 표준물을 크로마토그래피 종이의 각 측면에 샘플과 함께 수행하였다. 크로마토그래피 종이를 건조시키고, 표준물 레인은 산성 닌하이드린 용액으로 염색하였다. 표지된 Cth를 함유하는 각 샘플 레인의 영역을 절제하고, 5ml의 옵티-플루어(Opti-flour) 신틸레이션 칵테일(PerkinElmer, North Billerica, MA, USA)에 담그고 베크만(Beckman) LS-3801 신틸레이션 계수기에서 계수하였다. 효소 부재 샘플은 블랭크로서 사용하여 배경 방사성을 모니터링하였고 이는 각각의 샘플 중의 계수로부터 공제하였다. 순수한 효소 대조군의 경우, CBS 비활성 값은 mg CBS(즉, U/mg 단백질)당 효소 유닛(1㎛ol의 Cth/h를 생성하는 효소의 양)로 표시하였다. 혈장 샘플의 경우, 활성 값은 ㎕ 혈장(즉, mU/㎕ 혈장)당 밀리 단위(1nmol Cth/h를 생성하는 효소의 양)로 표현하였다.

[0407] **[0342]** 25mg/ml의공칭 값(포스페이트 완충 식염수, pH 7.4(PBS)에서 24.8-26.7mg/ml)을 갖는 이들 스톡 용액은 -80℃에서 분취량으로 저장하였다. 각 처리일에 단일 사용의 새로운 효소 용액은 스톡 용액을 PBS에 희석하여 1mg/ml의 최종 농도로 제조하고 이들을 7.5mg/kg의 용량으로 마우스에 전달하였다. 표적 용량을 투여하기 위해 주사된 용적은 지정된 날짜에 중량을 기준으로 계산하였다. 상기 일자동안 주사 완료시 나머지 임의의 용액을 버렸다.

[0408] **F. 웨스턴 블롯팅**

[0409] **[0343]** I278T-/- 마우스 4마리에 약물 생성물을 주사하고 첫 주사 24시간 후와 마지막 주사 72시간 후 혈액을 채취하여 대조군으로 사용하였다. 실시예 5의 모든 그룹으로부터의 D25 및 D27 혈장 샘플을 잠재적인 생체내 탈페길화를 검출하기 위해 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다. 혈장 샘플(레인당 4㎕)을 농도구배(4%-20%) MiniProtean TGX 겔(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 부하하고 변성 환원 조건하에서 전기영동으로 단백질을 분리하였다. 분자량 마커(Precision Plus Protein Dual Color Standard, Bio-Rad) 및 각 제제의 분취량(레인당 150-500ng)을 유사하게 처리하고 혈장 샘플과 함께 전기영동하였다. 전기영동 분리 후, 단백질 밴드를 PVDF 막(BioRad)으로 옮겼다. 개별 막을 차단 용액(0.02% Tween 20을 갖는 PBS 중 5% 무지방 밀크)에서 4℃에서 밤새 차단하였다. 그런 다음 막을 세척하고 토끼 폴리클로날 항-hCBS 항체(Orphan Technologies UCD Kraus lab 배치 # R2B2, 차단 용액에서 5000배 희석된 항혈청)로 1시간 동안 항온처리하였다. 그런 다음 막을 세척하고 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 접합된 항-토끼 IgG(Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA, 차단 용액에서 5000배 희석된)로 30분 동안 항온처리하였다. 막을 세척한 후, 밴드는 화학발광 기질로 5분동안 항온처리함에 의해 가시화하고(문헌참조: SuperSignal West Pico, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 이어서 투명한 청색 X선 필름(CL-Xposure Film, ThermoFisher Scientific)상에 신호 포획하였다. 현상된 필름은 평판(flatbed) 스캐너(Perfection V550 Photo Color Scanner, Epson, Long Beach, CA, USA)를 사용하여 스캔하였다.

[0410] **G. 화학물질**

[0411] **[0344]** 달리 기재되지 않는 경우, 모든 재료는 제조원(Sigma or Fisher Scientific)으로부터 구입하였다. L-[U-14C]-세린은 제조원(Perkin Elmer Life Sciences)으로부터 수득하였다.

[0412] **H. 혈장 수거 및 분석**

[0413] **[0345]** 턱밑(submandibular) 출혈을 위한 1회용 란셋은 리튬 헤파린을 갖는 BD 마이크로테이너(Microtainer) PST 튜브(Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)로의 혈액 수거에 사용되었다. 튜브는 이어서 5분동안 10,000×g에서 원심분리하고 이어서 1.5ml의 튜브로 혈장을 옮기고 -80℃에서 저장하였다. 혈장 황 아미노산 대사산물은 다른 곳에 기재된 바와 같이 안정한 동위원소 희석 액체 크로마토그래피 직렬 질량 분광측정(LC-MS/MS)에 의해 결정하였다.

[0414] **I. 동물 연구**

[0415] **[0346]** 연구는 사람 I278T 돌연변이체 CBS 전이유전자를 발현하는 마우스(I278T CBS -/- (I278T -/-) 마우스)의 CBS 녹아웃 변종(strain)을 사용하여 수행하였다. C57BL6 배경에서 이형접합 유전자전이 I278T 마우스의 육종 쌍은 와렌 크루거(Warren Kruger) 박사(Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, USA)에 의해 제공되었다. 상기 마우스는 마우스 CBS 유전자가 녹다운되었고, 또한 메탈로티오네인 프로모터의 제어하에 I278T 사람 CBS를 발현한다(문헌참조: Wang, *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14, 2201-2208, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 돌연변이 효소는 CBS WT 활성의 약 2%-3%를 가지며, 유전자전이 발현은 CBS 녹아웃 동형 접합 마우스에서 정상적으로 관찰되는 신생아 치사율을 구제한다(문헌참조: Watanabe *et al.* (1995) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92, 1585-1589; Maclean *et al.* (2010) Molecular Genetics and Metabolism 101, 163-171; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 달리 명시되지 않는 경우, 동물은 표준 조사된 압출 설치류 먹이(Teklad 2920X, Envigo, Invigo, IN, IN, USA)에서 유지하였다.

[0416] **[0347]** CBS 동형접합 유전자전이 연구 동물을 생산하기 위해, 동형접합 또는 이형접합 수컷을 이형접합 암컷과 교배하여 다른 유전자형 중에서 CBS 동형접합(-/-) 새끼를 포함하는 새끼를 생산하고 모두 I278T 전이유전자를 발현한다. 육종 쌍 및 신생아 마우스에 아연(음용수에 25mM 황산아연)을 제공하여 전이유전자 발현을 유도하였다. 호모시스틴뇨증 (HCU) 표현형을 갖는 동형접합 변종(I278T-/-)은 CBSDH에 대한 모델로서 사용하고, 수득된 다른 유전자형은 상기 연구에서 사용되지 않았다(문헌참조: Wang, *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14, 2201-2208, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0417] **[0348]** 이 연구에 사용된 모든 동물 절차는 모든 연방, 주 및 지방 법률, 규정 및 정책을 준수하는 콜로라도 덴버 대학 IACUC 대학에서 검토 및 승인되었다. 콜로라도-덴버 대학은 AAALAC 인증(#00235), 공중 보건 서비스 보증(#A 3269-01) 및 USDA 인증(#84-R-0059) 기관이다. 마우스를 포함하는 절차는 IACUC 승인 프로토콜# B-49414(03)1E 하에 수행하였다.

[0418] **[0349]** 마우스는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(Wang, *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14, 2201-2208)에 이전에 기재된 바와 같이 본원 발명자들의 시설에서 번식시키고 유전자형 분류하였다. 육종 쌍은 압출된 표준 식이 2920X(Envigo, CA, USA)와 25mM ZnCl2를 함유하는 물에서 유지시켜 전이유전자 발현을 유도하여 동형 접합 I278T 새끼를 신생아 죽음으로부터 구제하였다. 21일령에 이유 후, 동형 접합 I278T 마우스와 이들의 WT 형제자매를 8개 그룹 중 하나에 할당하였다. 24일령에 마우스를 정상(Envigo TD.170063, 4% Met; 그룹 A, B, C 및 D) 또는 제한된 메티오닌 함량(Envigo TD.110591, 0.5% Met; 그룹 E, F, G 및 H)을 함유하는 아미노산이 정의된 식이로 전환시켰다. 24일째의 새로운 식이 요법에 추가하여, 마우스는 또한 22주령을 통해 주 3회 피하 주사된 PBS 비히클(그룹 A, C, E 및 G) 또는 10 mg/kg 20NHS PEG-CBS(그룹 B, D, F 및 H)을 투여받았다. 마우스의 체중을 매주 칭량하여 해당 주의 20NHS PEG-CBS 주사 용적을 계산하는 데 사용하였다.

[0419] **J. 효소 저장 및 제조**

[0420] **[0350]** 액체 제형 중에 20NHS PEG-CBS를 본원에 기재된 바와 같이 cGMP 하에서 수행된 안정성 연구에 사용하였고, 이 연구로부터 다음 샘플을 수득하였다: 대조군 효소 또는 "대조군 제제" (T0-80C)는 -65℃ 미만에서 저장하였고 효소 샘플은 2일 (T2D-25C), 1개월 (T1M-25C), 및 6개월(T6M-25C) 동안 25℃에서 가속화된 안정성 조건하에서 항온처리하였다.

[0421] **<u>실시예 2. 약물 생성물 제제에서 페길화 수준의 감소 측정</u>**

[0422] **[0351]** 다양한 정도의 탈-페길화를 갖는 약물 생성물은 가속화된 안정성 연구를 위해 생성하였고, 상기 약물 생성물을 2일, 1개월 또는 6개월 동안 25℃에서 항온처리함에 의해 약물 생성물에 대한 "양호한 제조 수행" (GMP) 조건하에서 수행하였다. 대조군 샘플은 추천된 온도 범위 내, 즉, -65℃ 미만에서 저장하였다.

[0423] **[0352]** 제제 간의 페길화 차이는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)로 확인하였다. 10개의 고도로 페길화되고 덜 페길화된 종을 구분하고, 페길화 부재인 CBS 및 효소 변성시 방출된 헴 조인자 (P10)는 효소 변성시 방출된다. 각각의 샘플에서 탈페길화의 정도는 가변적으로 페길화되거나 완전히 페길화된 종에 상응하는 피크의 상대적 면적을 비교함에 의해 결정하였다. RP-HPLC 결과는 표 5에 나타낸다. "CBS"는 고유 (비변형된) 효소이고, 나머지 피크는 상이한 수준의 페길화를 갖는 제제이다.

[0424] [표 5]

피크 면적

| 피크 | 대조군 (%) | 2일 (%) | 1개월 (%) | 6개월 (%) |
|---|---|---|---|---|
| P10/헴 | 1.41 | 1.52 | 1.66 | 1.66 |
| CBS | 0.06 | 0.05 | 0.42 | 3.07 |
| P1 | 0.52 | 0.64 | 2.25 | 9.03 |
| P2 | 0.15 | 0.26 | 1.37 | 6.29 |
| P3 | 5.92 | 6.67 | 14.59 | 27.17 |
| P4 | 14.89 | 16.19 | 24.11 | 25.34 |
| P5 | 24.35 | 24.51 | 25.80 | 16.34 |
| P6 | 25.02 | 24.40 | 17.53 | 7.21 |
| P7 | 16.94 | 15.94 | 8.53 | 2.15 |
| P8 | 7.79 | 7.12 | 2.92 | 0.55 |
| P9 | 2.45 | 2.27 | 0.69 | 0.00 |
| P11 | 0.48 | 0.37 | 0.10 | 0.00 |

[0425]

[0426] **[0353]** RP-HPLC 분석은 대조군 샘플과 비교하여 25℃에서 1개월, 더 나아가 6개월 동안 항온처리된 제제에서 유의적인 탈-페길화가 존재함을 지적하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, 이들 샘플은 더 적은 페길화된 형태(예를 들어, P3)에 상응하는 더 높은 비율의 피크와 동시에 더 많은 페길화된 형태(예를 들어, P6 및 P7)에 대해 더 낮은 존재비의 피크를 나타냈다. 또한, 비변형(또는 완전히 탈페길화된) CBS에 해당하는 피크가 6개월 동안 항온처리된 제제에서 가장 두드러졌다. 그러나 25℃에서 2일 동안 항온처리된 제제에서 가변적으로 페길화된 종의 분포는 항상 -65℃ 이하에서 저장된 대조 효소의 분포와 더 유사하였다.

[0427] **실시예 3. 마우스에서 페길화의 감소된 수준을 갖는 제제의 효능**

[0428] **[0354]** 약물 생성물과 이의 탈페길화된 제제 중에 생물학적 동등성을 평가하기 위해, CBSDH의 생화학적 후유증, 즉, 상승된 호모시스테인(Hcy) 및 억제된 시스테인(Cys)을 포함한, 메티오닌 (Met) 대사물의 혈장 수준의 비정상을 재현하는 모델인 I278T CBS-/- (I278T-/-) 마우스에서 효능을 분석하였다. 혈장 아미노티올 (총 Cys 및 Hcy) 및 잔여 아미노산, 및 SAM 및 SAH는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Arning *et al.* (2016) Methods Mol Biol 1378, 255-262)에 기재된 바와 같이 수행된 LC-MS/MS에 의해 측정하였다.

[0429] **[0355]** I278T CBS-/- (I278T-/-) 마우스는 마우스 CBS 유전자가 결핍이고 CBSDH 환자에서 가장 광범위하게 발견된 병원성 돌연변이를 함유한, I287T 돌연변이체 사람 CBS 유전자를 발현한다. 이들 마우스는 야생형 CBS 활성의 대략 2%-3%를 나타내고 호모시스틴뇨증(HCU) 표현형을 갖는다(문헌참조: Wang, *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14, 2201-2208, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 이것은 Hcy, Met 및 S-아데노실호모시스테인(SAH)의 혈장 및 조직 수준 둘다의 상승과 혈장 Cth 및 Cys 수준의 동시 감소를 포함한다. 상기 마우스 변종은 본래에 기관(Fox Chase Cancer Center(Philadelphia, PA, USA))의 와렌 디 크루거 교수로부터 입수하였다.

[0430] **[0356]** 표준 (REG) 식이 상에서 유지된 수컷 및 암컷 성인 I278T-/- 마우스를 사용하여 효능을 시험하였다. 연구 시작 시, 마우스는 4개의 제제에 상응하는 4개의 그룹으로 나눈다. 혈액은 투여 전 적어도 1주에 기준선 측정을 위해 수거하였다. 혈액은 리튬 헤파린 및 겔(미국 노스캐롤라이나주 먼로의 Greiner Bio-One 또는 기타 공급업체의 동등한 제품)이 포함된 혈장 제제 튜브 내로 턱밑 샘플링을 위해 디자인된 1회용 란셋을 사용하여 의식이 있는 연구 동물의 턱밑 정맥에서 수거되었다. 1,200 x g에서 10분 동안 원심분리한 후 혈액 샘플에서 혈장을 수거하고 분석할 때까지 -80℃에서 1.5 ml 튜브에 저장하였다.

[0431] **[0357]** 1일(D1)에 시작하여, 마우스는 실험 그룹에 상응하는 각 제제의 주당(월요일, 수요일 및 금요일) 7.5mg/kg의 3회의 피하(SC) 주사를 받았다.

[0432] **[0358]** 치료는 24일동안 계속하였다. 제제 주사일은 D1, D3, D5, D8, D10, D12, D15, D17, D19, D22, 및 D24이다. 혈액은 마지막 주사 후 72시간 뿐만 아니라 주사후 24시간에 주당 적어도 1회 수거하였다. 기준선 (D0) 수거에 추가로, 혈액 샘플링은 D2, D11, D18, D25, 및 D27에 수행하였다. 수거 직후 모든 혈액 샘플에서 혈장을 제조하고 분석할 때까지 동결된 분취량으로서 저장하였다. 각 샘플의 분취량을 Met 대사물에 대해 분석한 반면, 일부(D25 및 D27)의 분취량도 실시예 4에 기재된 바와 같이 CBS 활성에 대해 분석하였다. 분석된 Met 대사물은 다음과 같다: Hcy, Cth, Cys, Met, Bet, 디메틸글라이신 (DMG), 글라이신 (Gly), 세린 (Ser), S-아데노실메티

오닌 (SAM), 및 S-아데노실호모시스테인 (SAH). 달리 지적되지 않는 경우, 성별 둘다에 대한 결과를 수집하였다.

[0433] **[0359]** 피하 주사로 투여되는 경우 분석된 Met 대사 산물의 혈장 수준을 개선하는 능력을 기준으로 제제를 비교하였다. 추가로, 상기 제제의 생체내 탈페길화는 동일한 마우스에서 조사하였다.

[0434] **[0360]** 기준선 (D0)에 추가로, 혈액 샘플링은 D2, D11, D18, D25, 및 D27에 수행하였다. 혈장은 수거 직후 모든 혈액 샘플로부터 제조하였고 분석때까지 분취량으로 동결 저장하였다. 각 샘플의 분취량을 Met 대사물에 대해 분석한 반면, 일부(D25 및 D27)의 분취량도 CBS 활성에 대해 분석하였다. 선택된 분취량(D2 및 D27)은 또한 생체내 20NHS PEG-CBS 탈-페길화를 평가하기 위해 웨스턴 블롯팅에 의해 분석하였다.

[0435] **[0361]** CBSDH 환자에서 Hcy 및 종종 Met의 혈장 및 조직 수준은 높은 반면 Cth 및 Cys의 수준은 낮다. 표준 식이 상의 I278T-/- 마우스는 혈장에서 상승된 Hcy 및 저하된 Cys 수준을 갖고, 따라서 CBSDH 환자에서 관찰된 대사 조절불능의 주요 측면을 요약한다(문헌참조: Wang, *et al.* (2005) Hum Mol Genet 14, 2201-2208, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 연구에서 분석된 대사물 중 혈장 Hcy는 임상적으로 가장 일반적으로 모니터링되는 마커이다(문헌참조: Morris *et al.* (2017) J Inherit Metab Dis 40, 49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0436] **[0362]** 혈장 Hcy, Cys, Cth, 및 Met 수준(평균 ± SEM)은 표 6에 나타낸다.

[0437] [표 6]

**평균 혈장 대사물 수준**

| | | Hcy | SEM | Cth | SEM | Cys | SEM | Met | SEM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 제제 | 일 | μM | μM | μM | μM | μM | μM | μM | μM |
| T0-80C | 0 | 484.3 | 41.1 | 0.7 | 0 | 145.3 | 6.9 | 50 | 1.5 |
| T2D-25C | | 490.6 | 62.7 | 0.7 | 0 | 136.6 | 3.4 | 61 | 3.5 |
| T1M-25C | | 451.5 | 51.8 | 0.7 | 0 | 126.1 | 20 | 58 | 2.2 |
| T6M-25C | | 483.5 | 35 | 0.7 | 0 | 150.4 | 6.5 | 82 | 21.6 |
| T0-80C | 2 | 193.5 | 14.6 | 73.9 | 1.7 | 191.3 | 15 | 54 | 5.3 |
| T2D-25C | | 151.3 | 10.6 | 69.9 | 2.2 | 192 | 25.3 | 71 | 7.2 |
| T1M-25C | | 174.8 | 10.7 | 101.1 | 10.3 | 175.5 | 12 | 88 | 5.2 |
| T6M-25C | | 203 | 18.1 | 99.1 | 14.8 | 134.5 | 7.9 | 86 | 7.6 |
| T0-80C | 11 | 121.3 | 11 | 43.3 | 3.4 | 223.8 | 12.6 | 54 | 3.9 |
| T2D-25C | | 111.8 | 8.8 | 53.5 | 2.1 | 224.5 | 5.8 | 76 | 8.3 |
| T1M-25C | | 130 | 4.3 | 51.8 | 8.3 | 233 | 8.1 | 61 | 5.8 |
| T6M-25C | | 194.8 | 23.1 | 81.8 | 18.7 | 156 | 12.2 | 85 | 17.4 |
| T0-80C | 18 | 109.9 | 19.8 | 64.8 | 8.2 | 194.3 | 5.7 | 55 | 1 |
| T2D-25C | | 103.2 | 18.1 | 78.1 | 9.8 | 201.3 | 9.9 | 77 | 2.9 |
| T1M-25C | | 124.7 | 19.5 | 100.5 | 5.6 | 198.3 | 16.3 | 75 | 3.5 |
| T6M-25C | | 197.8 | 41.1 | 62.5 | 11.7 | 191.7 | 4.1 | 51 | 4 |
| T0-80C | 25 | 134 | 26.9 | 61.2 | 9.2 | 205.8 | 22 | 55 | 1.6 |
| T2D-25C | | 88.3 | 5.8 | 53.4 | 4.3 | 237.3 | 18.1 | 61 | 1.9 |
| T1M-25C | | 144.9 | 34.6 | 67.4 | 10.4 | 222.5 | 23.2 | 61 | 6.6 |
| T6M-25C | | 226 | 39.1 | 65.9 | 4.6 | 155.3 | 18.8 | 54 | 4.6 |
| T0-80C | 27 | 245.3 | 10.8 | 67.1 | 8.5 | 159 | 5.6 | 52 | 3 |
| T2D-25C | | 260 | 21.7 | 93.9 | 9.8 | 119.3 | 1.2 | 81 | 8.4 |
| T1M-25C | | 301 | 51.6 | 59.2 | 11.6 | 145.1 | 20.4 | 54 | 10 |
| T6M-25C | | 343 | 40.5 | 29.1 | 1.9 | 120.8 | 11.4 | 52 | 4.4 |

[0438]

[0439] **[0363]** 표 6에 나타난 바와 같이, I278T-/- 마우스에서 혈장 Hcy 수준은 매우 높았고(D0에서 ≥450μM), 제제에 관계없이 첫 번째 주사의 24시간 이내에 실질적으로 하강하였다. 25℃에서 1개월 동안 항온처리된 제제(T1M-25C)는 상당한 탈-페길화를 진행하였고 -65℃ 미만에서 저장된 대조군 제제(T0-80C) 및 25℃에서 2일 동안 항온처리된 제제(T2D-25C)와 동등한 효능을 나타냈다. 전반적인 효과에 대한 통계적 분석은 6개월 동안 항온처리된 제제(T6M-25C)가 다른 제제보다 Hcy 수준을 기준으로 유의적으로 덜 효과적인 것으로 나타났다($p < 0.00501$). D27에서 Hcy 수준은 다른 2개의 제제에 대해 D0에서 보다 낮게 유지되었다($p < 0.01$). 대조적으로, 6개월 동안 항온처리된 제제(T6M-25C)는 여전히 효능이 있었지만 다른 제제보다는 유의적으로 덜하여($p < 0.01$), 다른 3개

그룹에서의 88-145μM에 비해 약 2000μM의 혈장 Hcy 수준을 유도하였다. 마지막 주사 후 72시간에 Hcy 수준은 부분적으로 증가했지만 아직 처리되지 않은 마우스의 수준으로 복귀하지 않았다(대조군 제제(T0-80C) 및 2일동안 항온처리된 제제(T2D-25C)에 대한 D27 대 D0에서 $p < 0.01$이지만, 1개월 동안 항온처리된 제제(T1M-25C) 및 6개월 동안 항온처리된 제제(T6M-25C)에 대해 유의적인 차이가 없음). 이들 결과는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Majtan *et al. Life Sci* 200, 15-25 (2018))에서 이전의 약력학 연구와 일치하였다.

[0440] **[0364]** 범용 효과의 통계학적 분석은 6개월 동안 항온처리된 제제가 다른 제제 보다 Cys 수준에 대해 유의적으로 낮은 효과를 가짐을 지적하였다($p < 0.001$). CBSDH 모델 마우스에서 억제된 혈장 Cys 수준은 제제(T6M-25C)가 6개월 동안 항온처리된 것을 제외하고는 모든 제제(약 200-250 μM)에 의해 정규화되었다. 상승된 Cys 수준은 주사 일정이 종료된 후 72시간 내에 기준선으로 복귀하였다.

[0441] **[0365]** 고도로 가변적이지만, 혈장 Cth 수준은 모든 제제를 사용한 처리에 의해 상승되었고 이는 모든 제제가 CBS 촉매 활성을 갖는다는 관찰과 일치하였다. 따라서, 6개월 동안 항온처리된 제제(T6M-25C)는 다른 3개의 제제와 비교하여 약력학 대신 약동학에서 차이를 가질 가능성이 보다 높다.

[0442] **[0366]** 혈장 Met 수준은 처리에 반응하여 현저한 패턴을 보여주지 않았고, 이는 문헌(참조: Majtan *et al.* J Inherit Metab Dis 41 (Suppl 1), S56 (2018))의 20NHS PEG-CBS 처리의 존재 또는 부재하에 CBSDH 모델 마우스에서 주로 식이 Met 섭취를 반영한다는 이전의 관찰과 일치하였다. 통계 분석은 4가지 제제 간에 Cth 수준에 유의한 차이가 없음을 나타냈다.

[0443] **[0367]** Hcy, Cys, Cth 및 Met 외에도 여러 다른 분석물이 대사물 패널에 포함되었으며, 이러한 대사물의 수준은 그룹간에 유의적인 차이가 없었다. 추가의 분석물은 표 7에 나타낸다.

[0444] [표 7]

**추가의 분석물 평균 수준**

| | | Ser | SEM | Gly | SEM | Bet | SEM | DMG | SEM | SAM/SAH | SEM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 제제 | 일 | μM | μM | μM | μM | μM | μM | μM | μM | 비율 | 비율 |
| T0-80C | 0 | 117 | 11.8 | 136 | 6.4 | 25.6 | 5.1 | 3 | 0.5 | 0.1 | 0 |
| T2D-25C | | 110.8 | 2 | 146.5 | 9.7 | 22.6 | 2 | 3 | 0.3 | 0.1 | 0 |
| T1M-25C | | 119.3 | 15.6 | 133.3 | 12.3 | 28.1 | 4.2 | 3.3 | 0.9 | 0.2 | 0.1 |
| T6M-25C | | 127.3 | 10 | 147.8 | 14.1 | 31 | 6.2 | 4.3 | 1.3 | 0.1 | 0 |
| T0-80C | 2 | 59.2 | 8.1 | 148.8 | 6.4 | 24.6 | 2.3 | 2.9 | 0.3 | 1.2 | 0.3 |
| T2D-25C | | 88.2 | 12.8 | 192 | 15.3 | 27.1 | 2.1 | 3.4 | 0.2 | 1.1 | 0.2 |
| T1M-25C | | 88.8 | 10.1 | 170.8 | 11 | 35.2 | 3.1 | 4 | 1 | 0.8 | 0.2 |
| T6M-25C | | 86.7 | 8.5 | 205.5 | 9.5 | 37.4 | 5.5 | 4.7 | 0.8 | 0.4 | 0.1 |
| T0-80C | 11 | 92.1 | 7.3 | 168.5 | 8.1 | 24.7 | 1.2 | 2.4 | 0.3 | 2.1 | 0.1 |
| T2D-25C | | 124.6 | 21.2 | 211.5 | 21.5 | 35.9 | 8.3 | 3.2 | 0.7 | 1.7 | 0.2 |
| T1M-25C | | 106 | 9 | 172.8 | 21.5 | 31 | 5.7 | 3 | 0.9 | 2 | 0.3 |
| T6M-25C | | 103.8 | 7.1 | 198 | 10.4 | 37.8 | 7.7 | 4.6 | 1.2 | 0.9 | 0.3 |
| T0-80C | 18 | 88 | 9.3 | 190.3 | 11.8 | 24.6 | 1.7 | 2.4 | 0.4 | 1.3 | 0.2 |
| T2D-25C | | 91.9 | 11 | 193 | 8.3 | 31 | 6.5 | 3 | 0.6 | 1.1 | 0 |
| T1M-25C | | 77.5 | 10.1 | 158 | 22 | 29 | 5.4 | 3.1 | 0.9 | 1 | 0.2 |
| T6M-25C | | 69.3 | 4.9 | 172 | 6.7 | 26.9 | 4.2 | 3.3 | 0.8 | 0.8 | 0.3 |
| T0-80C | 25 | 79.3 | 7.7 | 173.5 | 5.1 | 21.4 | 1.5 | 2.1 | 0.3 | 1.6 | 0.4 |
| T2D-25C | | 89.3 | 6.3 | 176.3 | 10.4 | 25.1 | 2.7 | 2.7 | 0.5 | 1.7 | 0.2 |
| T1M-25C | | 82.1 | 12.5 | 155.5 | 13.4 | 25.6 | 2.3 | 2.6 | 0.5 | 1.4 | 0.3 |
| T6M-25C | | 63.3 | 6 | 168.5 | 12.9 | 23 | 2.2 | 2.9 | 0.7 | 1 | 0.3 |
| T0-80C | 27 | 67 | 10.1 | 190.3 | 29.6 | 24.6 | 2.4 | 2.3 | 0.5 | 0.5 | 0.1 |
| T2D-25C | | 83.3 | 4.2 | 206 | 9.1 | 33.6 | 5.5 | 3.1 | 0.4 | 0.2 | 0.1 |
| T1M-25C | | 52.8 | 10.2 | 137 | 20.5 | 24.3 | 3.4 | 2.3 | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| T6M-25C | | 69.7 | 4.8 | 156.8 | 16.6 | 27.6 | 3.3 | 3 | 0.7 | 0.2 | 0 |

[0445]

[0446] **[0368]** 표 7에 나타낸 바와 같이(및 표 6에 제공된 바와 같이), T0-80C는 대조군 제제를 지칭하고, T2D-25C는 -25℃에서 2일 동안 항온처리된 제제를 지칭하고, T1M-25C는 25℃에서 1개월동안 항온처리된 제제를 지칭하고, T6M-25C는 25℃에서 6개월 동안 배양된 제제를 지칭한다. RP-HPLC 결과는 25℃에서 1개월 및 심지어 6개월에서도 시험관 내에서 항온처리된 20NHS PEG-CBS에서 상당한 탈페길화가 발생했음을 지적하였다. 그럼에도 불구하고, 모든 4개의 제제를 사용한 I278T-/- 마우스의 처리는 혈장 Hcy 수준의 급격한 저하를 유도하였지만,

가장 유의적으로 탈-페길화된 샘플 (25℃에서 6개월 동안 항온처리된 제제)에서 이러한 저하는 유의적으로 덜 현저하였다($p < 0.01$). 유사하게, 혈장 Cys 수준은 모든 제제에 의해 상승되었지만, 다시 25℃에서 6개월 동안 배양된 제제는 다른 제제보다 유의적으로 덜 효과적이었다($p < 0.001$). 치료 기간 동안에 수거된 모든 샘플은 기준선 수준 (D0)과 비교하여, 가변적이지만 이의 기질 Hcy 로부터 각각의 제제의 의해 형성된 생성물인 Cth의 상승된 혈장 수준을 보여주었다. 이는 제제가 모두 촉매 활성임을 나타내었으며, 주사 전에 제제에 대해 수행된 특정 활성 측정과 일치하는 발견이었다. 혈장 Met 수준은 치료에 의해 크게 영향을 받지 않았고, Met 수준은 약물 생성물 치료가 아닌 식이 섭취에 의해 대부분 영향을 받는 것으로 나타나는 본원 발명의 이전의 발견 및 모든 마우스가 연구 전반에 걸쳐 표준 식이 요법에 있었다는 사실과 일치한다. 모든 처리는 혈장 CBS 활성을 상승시켰지만, 다른 그룹과 비교하여 25℃에서 6개월 동안 항온처리된 제제를 받은 마우스에서 활성이 유의적으로 보다 낮았다($p < 0.01$). 따라서, 가장 탈-페길화된 제제로 처리하면 혈장에서 저하된 효소 활성을 유도하였고, 이는 생체 내에서 더 낮은 효능으로 해석된 반면, 다른 2개의 25℃ 항온처리된 제제는 대조군 샘플만큼 효과적이었다. 주지할만하게, 1개월 동안 항온처리된  제제는 대조군에 비해 유의적으로 탈-페길화되었고 대조군과 유사한 효능을 보여주었다. 2일, 1개월 또는 6개월 동안 항온처리 후 관찰된 탈-페길화 수준은 가속 안정성 시험 조건에서만 달성될 가능성이 있고, 임상 환경에서 발생할 가능성은 매우 낮다.

[0447] **실시예 4. 감소된 수준의 페길화를 갖는 제제의 효소 활성**

[0448] **[0369]** 마지막 주사 후 24 및 72시간에, 혈장 CBS 활성, D25 및 D27에 수거된 혈장 샘플 내 제제의 촉매 활성을 측정하였다.

[0449] **[0370]** 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Kayastha et al Anal Biochem 193(2), 200-203 (1991))에 기재된 비색측정 검정을 사용하여, 안정성 연구 결과는 6개월 항온처리 기간 동안에 CBS 비활성 (배치에 대해 200 ± 100 U/mg 단백질)에서 어떠한 상실을 지적하지 않았고, 각각 대조군, 2일, 1개월 및 6개월 제제에 대한 활성 측정은 145, 204, 170, 및 205 U/mg 단백질이었다.

[0450] **[0371]** 실시예 1에 기재된 바와 같이 방사성표지된 Ser의 전환을 기준으로 하는 또 다른 CBS 활성 검정을 또한 수행하였다. CBS 활성의 측정은 표 8에 나타낸다.

[0451] [표 8]

CBS 활성

| 샘플 | 일 | 분취량 중 Cth 수 [cpm] | 검정에서 총수 [cpm] | 검정에서 생성된 L-Cth [nmol] | CBS 비활성 [nmol/h/ul] | 평균 활성 [nmol/h/ul] | SEM [nmol/h/ul] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 블랭크 | NA | 65 | 0 | 0 | 0.00 | NA | NA |
| T0-80C (대조군) | | 11767 | 58510 | 341.64 | 97.61 | | |
| T2D-25C (대조군) | | 8696 | 43155 | 251.99 | 72.00 | | |
| T1M-25C (대조군) | | 9058 | 44965 | 262.55 | 75.02 | | |
| T6M-25C (대조군) | | 6705 | 33200 | 193.86 | 55.39 | | |
| T0-80C | 25 | 12166 | 60505 | 353.29 | 100.94 | | |
| T0-80C | | 9707 | 48210 | 281.50 | 80.43 | | |
| T0-80C | | 8665 | 43000 | 251.08 | 71.74 | | |
| T0-80C | | 16448 | 81915 | 478.31 | 136.66 | 97.4 | 14.4 |
| T2D-25C | | 12422 | 61785 | 360.77 | 103.08 | | |
| T2D-25C | | 12178 | 60565 | 353.64 | 101.04 | | |
| T2D-25C | | 10432 | 51835 | 302.67 | 86.48 | | |
| T2D-25C | | 10884 | 54095 | 315.86 | 90.25 | 95.2 | 4.0 |
| T1M-25C | | 13751 | 68430 | 399.57 | 114.16 | | |
| T1M-25C | | 15838 | 78865 | 460.50 | 131.57 | | |
| T1M-25C | | 11961 | 59480 | 347.31 | 99.23 | | |
| T1M-25C | | 8253 | 40940 | 239.05 | 68.30 | 103.3 | 13.4 |
| T6M-25C | | 5806 | 28705 | 167.61 | 47.89 | | |
| T6M-25C | | 6084 | 30095 | 175.73 | 50.21 | | |
| T6M-25C | | 5933 | 29340 | 171.32 | 48.95 | | |
| T6M-25C | | 3312 | 16235 | 94.80 | 이상점 (outlier) | 49.0 | 0.7 |
| T0-80C | 27 | 4707 | 23210 | 135.52 | 38.72 | | |
| T0-80C | | 3717 | 18260 | 106.62 | 30.46 | | |
| T0-80C | | 40 | -125 | -0.73 | 이상점 (outlier) | | |
| T0-80C | | 5804 | 28695 | 167.55 | 47.87 | 39.0 | 5.0 |
| T2D-25C | | 5410 | 26725 | 156.05 | 44.59 | | |
| T2D-25C | | 3852 | 18935 | 110.56 | 31.59 | | |
| T2D-25C | | 2989 | 14620 | 85.37 | 24.39 | | |
| T2D-25C | | 2450 | 11925 | 69.63 | 19.89 | 30.1 | 5.4 |
| T1M-25C | | 5357 | 26460 | 154.50 | 44.14 | | |
| T1M-25C | | 7348 | 36415 | 212.63 | 60.75 | | |
| T1M-25C | | 3253 | 15940 | 93.07 | 26.59 | | |
| T1M-25C | | 1665 | 8000 | 46.71 | 13.35 | 36.2 | 10.3 |
| T6M-25C | | 1463 | 6990 | 40.82 | 11.66 | | |
| T6M-25C | | 1668 | 8015 | 46.80 | 13.37 | | |
| T6M-25C | | 1048 | 4915 | 28.70 | 8.20 | | |
| T6M-25C | | 696 | 3155 | 18.42 | 5.26 | 9.6 | 1.8 |

[0452]

[0453] **[0372]** 상기 발견을 기준으로, 생체내 탈-페길화는 유의적이지 않았다. 또한, 항온처리된 제제에서 수준까지 및 수준을 포함하는 시험관내 가속화되는 경우, 탈페길화는 CBS 활성 또는 생체내 효능에 영향을 미치는 것으로 관찰되지 않았다.

[0454] **[0373]** Met 대사물의 개선과 일치하게, 모든 제제는 모든 그룹에서 혈장 CBS 활성을 상승시켰지만, 6개월 동안 항온처리된 제제는 D25에서 다른 제제보다 유의적으로 낮은 것으로 관찰되었지만($p < 0.04$) D27에서는 그렇지 않았다. 다시, 1개월 동안 항온처리된 제제에서 유의적인 탈-페길화는 생체 내에서 성취된 혈장 CBS 활성 수준에 영향을 미치지 않았고, 결과는 대조군의 결과와 유사하였다.

[0455] **[0374]** 대조군, 2일 동안 항온처리된 제제, 1개월 동안 항온처리된 제제 및 6개월동안 항온처리된 제제의 비활성은 동일한 방법으로 방사성활성 Ser 전환을 모니터링하여 검정했을 때 각각 2324.11, 1714.19, 1786.08 및 1318.76 U/mg 단백질이었다. 1개월 동안 항온처리된 제제(T1M-25C)는 대조군에 비해 유의적으로 탈-페길화되었고 대조군과 유사한 활성을 보여주었다.

[0456] **실시예 5. 생체내 탈-페길화의 웨스턴 블롯 분석**

[0457] [0375] 약물 생성물이 생체 내에서 탈-페길화에 적용되는지의 여부를 평가하기 위해, 대조군으로 처리된 CBSDH 모델 마우스로부터의 혈장 분취량은 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. D2에, 혈장 샘플 중 페길화 패턴은 주사 전 대조군의 것과 유사한 것으로 관찰되었고, 페길화되지 않은 어떠한 효소도 검출되지 않았고, 덜 페길화된 밴드의 보다 높은 풍부성에 대해 어떠한 명백한 경향이 없었다. 최종 주사 후 72시간에 수거된 D27에 모든 마우스에서 페길화되지 않은 효소가 약간 증가하였다. 그러나 페길화 패턴에서의 변화는 주입 전 물질과 비교할 때 최소였고, 상이한 밴드 간의 비율은 D27에서 D2와 거의 동일하였다. 유사하게, 생체내 탈-페길화는 심지어 주사 전에도 다른 제제와 함께 최소였고, 1개월 및 6개월 동안 항온처리된 제제는 특히 6개월 동안 항온처리된 제제에서 RP-HPLC에 의해 비변형 CBS를 포함하는 상당한 수준의 탈-페길화 효소를 나타내었다. 이들 대부분의 탈-페길화된 형태가 주사 후 보다 용이하게 분해되거나 더 보다 신속하게 제거되어 따라서 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 혈장 샘플에 존재하지 않았을 가능성이 있다. 다른 3개의 제제의 유사한 분석에서도 일단 이들이 생체내 주사되면 최소한의 탈-페길화를 보여주었다.

[0458] **실시예 6. 20NHS PEG-CBS를 사용한 장기 처리와 Met-제한 식이의 효능 비교**

[0459] [0376] 황 아미노산 대사의 조절불능은 사람 환자 및 질환의 마우스 모델 둘다에서 HCU 표현형의 주요 특성이다. 대사 제어의 지속적인 개선 또는 재획득은 성공적인 치료의 주요 양상이다(문헌참조: Morris *et al.* (2017) J Inherit Metab Dis 40, 49-74; Majtan *et al.* (2017) FASEB J 31, 5495-5506; Majtan *et al.* (2018) Enzyme Replacement Therapy Ameliorates Multiple Symptoms of Murine Homocystinuria. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 26, 834-844; each of which is hereby incorporated by reference in its entirety). 생후 4주차로부터 개시하여, 마우스는 정상(REG) 또는 제한된(MRD) 메티오닌 함량을 갖는 식이 요법 중에 유지하고 연구가 22주차에 종료될 때까지 PBS 비히클 또는 10mg/kg의 20NHS PEG-CBS를 주 3회 피하 주사하였다. 표9는 18주령에서 마우스 내 혈장 황 대사물의 수준을 보여준다. 총 호모시스테인, 총 시스테인, 시스타티오닌, 메티오닌 및 SAM/SAH 비율의 혈장 농도에서 대표적인 스냅샷이 제공된다. 본원의 상기 실시예 및 후속 실시예에서 기재되고 분석된 연구 그룹은 다음과 같이 요약된다:

[0460] [0377] WT(REG+PBS)는 PBS의 피하 주사를 받은 정상 식이 요법 중의 야생형 마우스를 지칭하며;

[0461] [0378] WT (REG+20 NHS PEG-CBS)는 20NHS PEG-CBS의 피하 주사를 받은 정상 식이 요법 중의 야생형 마우스를 지칭하고;

[0462] [0379] I278T (REG+PBS)는 PBS의 피하 주사를 받은 정상 식이 요법 중의 I278T 마우스를 지칭하고;

[0463] [0380] I278T (REG+20NHS PEG-CBS)는 20NHS PEG-CBS의 피하 주사를 받은 정상 식이 요법 중의 I278T 마우스를 지칭하고;

[0464] [0381] WT(MRD+PBS)는 PBS의 피하 주사를 받은 Met 제한 식이 요법 중의 야생형 마우스를 지칭하고;

[0465] [0382] WT (MRD+20NHS PEG-CBS)는 20NHS PEG-CBS의 피하 주사를 받은 Met 제한 식이 요법 중의 야생형 마우스를 지칭하고;

[0466] [0383] I278T (MRD+PBS)는 PBS의 피하 주사를 받은 Met 제한 식이 요법 중의 I278T 마우스를 지칭하고;

[0467] [0384] I278T (MRD+20NHS PEG-CBS)는 20NHS PEG-CBS의 피하 주사를 받은 Met 제한 식이 요법 중의 I278T 마우스를 지칭한다.

[0468] [표 9]

**혈장 대사물 수준**

| 마우스 모델 | 혈장 대사물 [uM] | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | tHcy | SEM | tCys | SEM | Cth | SEM | Met | SEM | SAM/SAH 비율 | SEM |
| WT (REG+PBS) | 13.4 | 1.0 | 294.7 | 7.2 | 1.4 | 0.1 | 52.0 | 2.1 | 3.3 | 0.2 |
| WT (REG+20NHS PEG-CBS) | 5.5 | 0.3 | 281.1 | 7.3 | 10.9 | 0.6 | 65.5 | 5.8 | 4.9 | 0.3 |
| I278T (REG+PBS) | 423.0 | 22.1 | 104.5 | 3.6 | 1.0 | 0.1 | 59.6 | 3.0 | 0.1 | 0.0 |
| I278T (REG+20NHS PEG-CBS) | 40.7 | 2.8 | 268.5 | 8.9 | 76.0 | 7.2 | 71.5 | 4.3 | 2.3 | 0.2 |
| WT (MRD+PBS) | 15.7 | 1.8 | 304.1 | 9.7 | 1.0 | 0.1 | 31.9 | 1.6 | 3.8 | 0.2 |
| WT (MRD+20NHS PEG-CBS) | 6.1 | 0.4 | 278.8 | 9.4 | 8.3 | 0.8 | 21.0 | 1.4 | 4.9 | 0.3 |
| I278T (MRD+PBS) | 139.8 | 16.1 | 257.6 | 4.7 | 0.6 | 0.0 | 50.9 | 1.9 | 1.8 | 0.3 |
| I278T (MRD+20NHS PEG-CBS) | 13.7 | 1.5 | 327.3 | 13.2 | 17.7 | 1.3 | 29.9 | 1.7 | 4.0 | 0.4 |

[0469]

[0470] [0385] 표 9에 나타낸 바와 같이, 식이 요법 또는 치료에 상관없이 WT 마우스에서 혈장 Hcy 수준은 정상 건강한

범위(약 16μM)에 있었다. 그러나, 비히클을 받은 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스에서, 혈장 Hcy 수준은 대조군에 비해 크게 상승하였다(423 μM, p<0.001). MRD 식이 요법 중에서, 혈장 Hcy 수준은 상당히 낮았지만(140μM, 즉 67% 감소) 대조군에 비해 여전히 현저하게 상승된 상태로 남아있다(p<0.001). 20NHS PEG-CBS 처리는 비히클-주사된 I278T 마우스와 비교하여 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스에서 혈장 Hcy 수준을 41 μM(90% 감소, p<0.001)으로 유의적으로 감소시켰고 MRD 식이 요법 중에서 마우스에서 14 μM로 완전히 정상화되었다(p<0.001). 혈장 Cys 수준은 대조군(105 대 295 μM, p<0.001)에 비해 비히클을 투여받는 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스에서 거의 3배 낮았고 나머지 모든 그룹에서는 정상 범위 내에 있었다. 20NHS PEG-CBS에 의해 촉매되는 반응의 생성물로서의 역할과 일치하게, 혈장 Cth 수준은 이들의 비히클 주사된 대응물과 비교하여 20NHS PEG-CBS 치료를 받은 모든 마우스에서 상승하였다. 혈장 Cth의 상승은 제한 기질인 Hcy의 농도에 의존하고, REG 및 MRD 식이 요법 중의 I278T 마우스에서 각각 76 및 18 μM에 도달한다(p<0.001). 20NHS PEG-CBS는 기질 농도가 비히클을 받은 대조군과 비교하여 20NHS PEG-CBS 처리된 대조군에서 약 8배 더 높은 혈장 Cth 수준에 의해 지적된 바와 같이 매우 낮은 경우에도 이의 효능을 유지하였다. 혈장 Met 수준은 MRD 식이 요법 중에서 보다 REG 상에서의 모든 그룹에서 보다 높았다. 그러나 MRD 상의 I278T에서 혈장 Met 수준은 REG 식이 요법 중의 대조군과 유사했으며(51 대 52 μM, p=ns) 20NHS PEG-CBS 처리(30 μM, p<0.001)에 의해 정상화되었다. 메틸화 능력을 반영하는 SAM 대 SAH의 비율은 각각의 대조군(REG 및 MRD 식이 요법 중의 각각 WT에서 3.29 및 3.84; p<0.001)과 비교하여 REG 식이 요법(0.12)의 I278T 마우스에서 실질적으로 감소하고 MRD 식이 요법 (1.77) 상에서 부분적으로 상승하였다. 20NHS PEG-CBS 처리를 사용하여, SAM/SAH 비율은 유의적으로 개선되었고, 각각 REG (2.26, p<0.001) 및 MRD (4.01, p<0.001) 상에서 I278T 마우스에서 완전히 정상화되었다. 일반적으로 W18 시점에 대해 여기에 기재된 그룹 간의 차이는 전체 연구 과정 동안에 관찰된 것과 일치하였다.

[0471] **[0386]** CBS 결핍 HCU 관리 지침은 피리독신에 완전히 반응하는 환자와 반응하지 않는 환자에서 각각 혈장 총 Hcy 농도를 50 및 100μM 미만으로 유지할 것을 권장한다(문헌참조: Morris *et al.* (2017) J Inherit Metab Dis 40, 49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 본 발명의 연구에서 I278T 마우스는 마우스의 표준 권장 섭취량(MRD 및 REG 식이에서 각각 0.5g/kg 및 4g/kg Met)보다 8배 적은 Met를 받은 심각한 Met 제한을 유지하더라도 상기 목표 수준을 달성할 수 없었다. 6주령에서 채취한 초기 샘플을 제외하고, 혈장 Hcy 수준은 연구 동안 MRD 상의 I278T 마우스에서 121-195μM 사이에서 변동하였다. 문헌(참조: Gupta *et al.* (2014))에 나타낸 바와 동일한 마우스 모델을 사용하여, 시스타티오닌 베타-신타제-결핍 마우스는 메티오닌 저함량 식이 요법 중에서 번식시킨다. 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(FASEB J 28, 781-790)에서는, 0.5g/kg Met를 함유하는 유사한 MRD 식이 요법이 34주령의 I278T 마우스에서 혈청 Hcy를 81 μM로 감소시키는 것으로 밝혀졌다. 상기 차이는 마우스의 연령 및 식이 요법 중의 이들의 유지 길이에 기인할 수 있다. 대조적으로, REG 식이 요법 및 20NHS PEG-CBS로 처리된 I278T 마우스의 혈장 Hcy 수준은 22주령에 채취한 마지막 샘플을 제외하고는 26-41μM 범위에서 다양하였다. 또한, MRD 식이 요법 중의 I278T 마우스에 20NHS PEG-CBS를 투여하면 혈장 Hcy가 15μM 미만으로 완전히 정상화되었다. 상기 데이터는 ET와 달리 심각한 Met 제한조차도 HCU 마우스에서 혈장 Hcy 수준을 치료 목표로 가져올 수 없음을 시사한다. 완전한 대사 정상화가 필요한 경우 상기 목표를 달성하기 위해 ET와 일정 수준의 Met 제한의 조합이 필요할 것이다.

[0472] **[0387]** 이들 결과는 HCU 표현형의 보정을 달성하기 위해 완전한 대사 정상화가 필요하지 않다는 증거이며 따라서 마우스에서 HCU 표현형의 발현과 관련되는 경우 역치 효과가 존재하는 것으로 보인다. 사실, 혈장 Hcy 수준이 170 내지 300μM인 HCU의 덜 심각한 마우스 모델은 훨씬 덜 심각한 표현형을 가졌다(문헌참조: Gupta et al.(2009)). 시스타티오닌 베타-신타제 결핍의 마우스 모델은 고호모시스테인혈증의 상당한 역치 효과를 밝힌다. 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: FASEB J 23, 883-893)는 HCU의 어떠한 임상적 증상을 보여주지 않았다(문헌참조: Majtan *et al.* (2018) Human mutation 39, 210-218, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 상기 역치는 치료 받은 HCU 환자뿐만 아니라 사람 환자에게도 적용되는 것으로 보이며 대사 정상화에 실패했음에도 불구하고 혈관 사건의 감소된 위험과 발생률을 보여주었다(문헌참조: Wilcken *et al.* (1997) Journal of Inherited Metabolic Disease 20, 295-300; Yap *et al.* (2000) Vascular complications of severe hyperhomocysteinemia in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: effects of homocysteine-lowering therapy. Seminars in thrombosis and hemostasis 26, 335-340; Yap *et al.* (2001) Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 21, 2080-2085; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0473] **실시예 7. 유동-매개된 혈관확장 (FMD)**

[0474] **[0388]** I278T 마우스는 내피 기능 장애를 앓고 있으며 혈전 색전증은 HCU 환자의 이환율 및 조기 사망의 주요 원인이다(문헌참조: Majtan *et al.* (2018) Human mutation 39, 210-218, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 내피 기능부전의 존재는 심혈관 위험과 밀접한 관련이 있기 때문에, 연구 마우스의 대퇴 동맥에서 내피 의존성 유동-매개된 혈관 확장(FMD)을 평가하였다(데이터는 나타내지 않음). 내피 의존성 유동-매개된 혈관확장은 문헌(참조: Schuler *et al.* (2014) Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 34, 2651-2657, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 마우스는 이소플루란 (3% 유도 및 1.5% 유지)으로 마취시켰다. 체온은 EKG 전극이 또한 장착된 가열된 조사 표를 사용함에 의해 37±1℃로 유지하고 직장 온도계 프로브를 사용하여 모니터링하였다. 뒷다리를 면도하고 따뜻한 초음파 겔로 덮었다. 초음파 프로브를 정위 홀더에 부착시키고 상부 안쪽 허벅지에서 보이는 대퇴 정맥과 수동으로 정렬하였다. 30-70MHz 선형 어레이 마이크로스캔 변환기(Fujifilm VisualSonics, Toronto, ON, Canada)가 장착된 고주파, 고해상도 Vevo 2100 이미지화 플랫폼을 사용하여 마우스에서 대퇴 동맥을 이미지화하였다. 혈관 폐쇄기(Docx, Ukiah, CA, USA)를 하지 주위에 배치하여 허혈 유발인자로서 말단 뒷다리의 폐쇄를 유도하였다. 혈관벽의 명확한 이미지가 수득되고 기준선 판독값이 기록되면 실험은 혈관 폐색기를 5분 동안 팽창시켜 개시하였다. 뒷다리 허혈 후, 커프(cuff)를 수축시키고 FA 직경 측정을 30초 간격으로 5분 동안 계속 기록하였다. 획득한 이미지의 대퇴 동맥 직경은 오프라인에서 수동으로 결정되었다.

[0475] **[0389]** 뮤린 HCU의 임상 증상에 대한 약물 생성물의 장기 투여 효과를 결정하기 위해, Met-제한 식이(MRD)에 대한 I278T 마우스(+/+ 및 -/-)에 비히클(PBS) 또는 20NHS-CBS를 22주령을 통해 1주 3회 10 mg/kg(약물 생성물)으로 투여하였다. 마우스는 2개의 식이 요법 중 하나에 있다: 1) 4.0g/kg Met를 갖는 규칙적인 식이(REG), 또는 2) 0.5g/kg Met를 갖는 Met 제한 식이(MRD). 마우스는 하기의 그룹으로 나누어진다: A (+/+, REG, PBS); B (+/+, REG, 약물 생성물); C (-/-, REG, PBS); D (-/-, REG, 약물 생성물); E (+/+, MRD, PBS); F (+/+, MRD, 약물 생성물); G (-/-, MRD, 약물 생성물); H (-/-, MRD, 약물 생성물).

[0476] **[0390]** I278T 마우스는 표현형을 정상화하는 약물 치료로 대조군 그룹(+/+)과 비교하여 대퇴 동맥 유연성(즉, 동맥 강성)의 상당한 손실을 나타내는 것으로 관찰되었다. 기준선 T0에서 대퇴 동맥 직경은 REG 식이 요법 중의 마우스에서 관찰된 것보다 MRD 상의 마우스에서 보다 작은 것으로 관찰되었다. 기준선 값을 기록한 후 5분간 혈류가 없는 폐색은 기준선으로 복귀하기 전에 동맥 직경의 일시적인 증가를 특징으로 하는 반응성 충혈을 유도하였다. 표 10은 19주령 마우스에서 평가된 바와 같은 REG 또는 MRD 식이 요법상의 마우스의 대퇴 동맥 직경을 보여준다.

[0477] [표 10]

**대퇴 동맥 직경**

| 마우스 모델 | 시점 [분] | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | -120 | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 210 | 240 | 270 | 300 |
| WT (REG+PBS) | 197.0 | 204.4 | 222.8 | 232.7 | 238.4 | 234.6 | 225.8 | 218.6 | 210.9 | 201.7 | 199.2 | 197.1 |
| SEM | 1.0 | 1.6 | 2.1 | 2.2 | 1.8 | 2.9 | 3.0 | 3.5 | 2.5 | 1.0 | 1.4 | 1.4 |
| WT (REG+20NHS PEG-CBS) | 196.6 | 209.4 | 225.9 | 232.0 | 231.4 | 232.7 | 227.7 | 222.2 | 218.4 | 211.8 | 207.6 | 202.7 |
| SEM | 1.4 | 3.0 | 4.9 | 4.5 | 3.8 | 3.8 | 3.6 | 3.6 | 3.9 | 3.3 | 2.7 | 2.8 |
| I278T (REG+PBS) | 196.3 | 205.6 | 205.7 | 209.4 | 215.6 | 215.7 | 211.5 | 210.8 | 205.8 | 202.5 | 198.1 | 198.0 |
| SEM | 1.5 | 0.6 | 2.8 | 2.2 | 2.7 | 3.4 | 2.8 | 2.6 | 2.4 | 2.0 | 1.6 | 1.2 |
| I278T (REG+20NHS PEG-CBS) | 194.8 | 203.6 | 215.9 | 226.5 | 231.7 | 232.3 | 229.1 | 222.5 | 216.9 | 208.6 | 203.1 | 199.9 |
| SEM | 2.0 | 2.8 | 3.3 | 3.4 | 4.5 | 4.5 | 4.4 | 4.5 | 4.2 | 4.1 | 3.1 | 2.3 |
| WT (MRD+PBS) | 194.0 | 202.8 | 214.5 | 219.1 | 227.9 | 223.6 | 219.2 | 211.8 | 204.2 | 198.6 | 195.7 | 194.2 |
| SEM | 2.3 | 1.8 | 2.9 | 2.5 | 3.3 | 3.3 | 3.2 | 2.9 | 2.8 | 2.4 | 2.5 | 2.4 |
| WT (MRD+20NHS PEG-CBS) | 195.6 | 203.3 | 218.9 | 226.5 | 229.7 | 227.4 | 219.7 | 215.9 | 209.7 | 202.7 | 199.4 | 196.8 |
| SEM | 1.4 | 1.6 | 2.4 | 3.1 | 2.5 | 2.9 | 2.4 | 3.0 | 2.4 | 1.7 | 1.4 | 1.3 |
| I278T (MRD+PBS) | 196.0 | 204.1 | 216.5 | 225.8 | 230.4 | 232.5 | 226.2 | 220.0 | 213.7 | 208.3 | 203.1 | 199.5 |
| SEM | 2.0 | 2.3 | 2.0 | 2.9 | 2.8 | 1.7 | 2.8 | 3.0 | 3.1 | 3.2 | 3.0 | 2.7 |
| I278T (MRD+20NHS PEG-CBS) | 195.6 | 208.9 | 222.7 | 229.5 | 236.2 | 234.8 | 225.3 | 219.4 | 212.2 | 205.9 | 201.5 | 198.7 |
| SEM | 2.5 | 2.0 | 3.5 | 3.3 | 3.1 | 2.8 | 2.1 | 3.5 | 3.3 | 3.3 | 3.5 | 2.9 |

[0478]

[0479] **[0391]** 표 10에 나타낸 바와 같이, 비히클을 투여받는 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스는 대조군과 비교하여 5분 허혈 후 60초 및 90초 시점(둘 다 216㎛)에서 대퇴 동맥의 최대 확장이 상당히 더 낮음으로 표시되는 바와 같이 내피 기능부전을 명확하게 보여주었고( 238 및 235 ㎛, $p<0.001$), I278T 마우스도 동일한 식이 요법 중에 있지만 20NHS PEG-CBS 처리를 받았다(둘 다 232 ㎛, $p<0.01$). REG 식이 요법상에서 비히클을 투여받은 I278T 마우스는 다른 모든 그룹과 비교하여 유의적으로 감소된 반응을 보여주었다. 대조적으로, MRD 식이 요법 중의

마우스의 어떠한 것도 손상된 내피 기능의 임의의 징후를 보이지 않았고 20NHS PEG-CBS 처리 유무에 관계없이 허혈에 대해 정상적인 혈관 반응을 나타내지 않았다.

[0480] **[0392]** MRD에 대한 I278T 마우스의 치료는 대퇴 동맥 직경을 REG 식이 요법상의 마우스와 동일한 수준으로 정상화하는 것으로 관찰되었다.

[0481] **실시예 8. 경동맥 화학 손상 혈전증 모델(CITM)**

[0482] **[0393]** 경동맥 화학 손상 혈전증 모델(CITM)의 측정은 문헌(참조: Marchi *et al.* (2012) Thrombosis and hemostasis 108, 516-526, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 케타민(유도 용량 80-100 mg/kg, 유지를 위해 10-20 mg/kg/hr) 및 자일라진(유도 용량 8-16 mg/kg, 그 다음 유지를 위해 1-2mg/kg/hr)의 조합물을 복막 내 주사하여 마우스를 마취시켰고, 체온을 가열 패드를 사용하여 36-38℃로 유지하고 직장 온도계 프로브로 모니터링하였다. 기관을 노출시키고 캐뉼러를 삽입하고 동물을 공기 및 보충 산소로 기계적으로 환기시켰다. 통상의 경동맥이 노출되었고, 0.5 PBS 도플러 흐름 프로브로 기준선 흐름을 모니터링하였다(Transonic Systems, Ithaca, NY, USA). 동맥 손상을 위해 10% 염화 제2철 용액에 적신 1x1mm Whatman 여과지를 경동맥에 1분 동안 두었다. 초음파 프로브를 사용하여 혈관 내 혈류를 최대 20분 동안 모니터링하고 기록하였다. 폐색 시간(TTO)은 FeCl3 투여와 1분 동안의 유동 부재 사이의 시간으로 정의되었다. 혈액을 하대정맥에서 3.2% 나트륨 시트레이트로 세정된 주사기에 채혈하고 5,000xg에서 10분 동안 원심분리하여 혈소판이 부족한 혈장으로 가공하였다. 절차 말기에 마우스를 자궁 경부 탈구 후 양측 개흉술로 안락사시켰다. 표 11은 경동맥 화학적 손상 혈전증 모델(CITM)로부터의 결과를 보여준다. 10% $FeCl_3$에 의해 유도된 화학적 손상 후 경동맥에서 안정 폐색에 대한 시간은 22주령 마우스에서 결정하였다. REG 식이 요법 및 히클을 받은 I278T 마우스만이 폐색까지의 유의적으로 증가된 시간을 보여주었고 반면, MRD 식이 요법 및/또는 20NHS PEG-CBS 를 사용한 처리는 이 매개변수를 대조군 수준으로 정상화시켰다. 표 11에서 "CBS"는 20NHS PEG-CBS를 나타낸다.

[0483] [표 11]

**폐색까지의 시간**

| | 야생형 (WT) | | | | I278T | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | REG+ PBS | REG+ CBS | MRD+ PBS | MRD+ CBS | REG+ PBS | REG+ CBS | MRD+ PBS | MRD+ CBS |
| 폐색까지의 시간[min:초:ms] | 8:41:40 | 8:48:30 | 9:17:51 | 8:26:14 | 10:58:42 | 8:48:39 | 7:33:55 | 7:53:26 |
| SEM | 12:19:29 | 12:30:24 | 12:40:56 | 12:17:19 | 12:47:22 | 12:34:05 | 12:24:22 | 12:25:21 |

[0484]

[0485] **[0394]** I278T 마우스는 실험적 혈전증의 지연을 보여주었고, 이는 어느 한 치료에 의해 정상화되었다. I278T 마우스가 혈전증 촉진 표현형을 나타내는지 여부와 만약 그렇다면 식이 요법과 효소 치료요법이 그것에 어떻게 영향을 미치는지의 여부를 평가하기 위해, 10% $FeCl_3$를 사용하여 통상의 경동맥의 실험적 혈전증을 유도하였다. REG 식이 요법상의 비히클 주사된 I278T 마우스는 다른 그룹보다 안정한 폐색까지의 훨씬 더 긴 시간(10분 59초)을 나타냈고, 이는 HCU 환자와 달리 I278T 마우스는 혈전증 촉진 표현형을 나타내지 않았고, 더욱이 대조군과 비교하여 혈전증의 상당한 지연을 보주었다(8분 42초, $p<0.05$). 흥미롭게도, I278T 마우스를 20NHS PEG-CBS(8분 49초) 또는 MRD 식이(7분 34초)로 처리하면 폐색에 대한 시간이 대조군에서 나타난 값으로 정규화되었다.

[0486] **[0395]** 혈전색전증은 HCU에서 이환률 및 사망률의 주요 원인이지만(문헌참조: Mudd, *et al.* (2001) Disorders of transsulfuration. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., and Vogelstein, B., eds) pp. 2007-2056, McGraw-Hill, New York; Morris *et al.* (2017) *J Inherit Metab Dis* 40, 49-74; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨), 위약을 투여받은 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스는 유의적인 내피 기능부전에도 불구하고 혈전증에 대한 경향을 나타내는데 실패하였다. 유사한 발견은 초기에 동일한 I278T 마우스 모델을 사용하고(문헌참조: Dayal *et al.* (2012) Blood 119, 3176-3183, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨) 및 총 CBS 녹아웃 마우스(문헌참조: Maclean *et al.* (2010) Molecular Genetics and Metabolism 101, 163-171; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 대해서 보고되었다.

[0487] **[0396]** 내피 기능부전과 역설적으로 폐까지의 연장된 시간 둘다는 MRD 식이 요법 또는 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스에서 정상화되었지만 20NHS PEG-CBS로 처리되었다. 이들 결과는 I278T 마우스에서 과응고 상태가 부재임에도 불구하고 Met 제한 또는 20NHS PEG-CBS의 투여가 HCU의 다른 마우스 모델에서, 그리고 더 중요하게

는 인간 환자에서 관찰된 병리학적 지혈을 보정하는 데 효과적일 수 있음을 나타낸다.

[0488] **실시예 9. 행동 시험**

[0489] **[0397]** 모든 행동 연구에서 실험자는 마우스의 유전자형, 식이 요법 및 치료와 관련하여 맹검이었다. 개방 필드 작업은 불안과 같은 행동의 양상을 조사한다(문헌참조: Prut *et al.* (2003) European journal of pharmacology 463, 3-33, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 마우스는 10분 시험 동안 상기로부터 추적하면서 자유롭게 개방 박스(44x44x24cm)를 탐색하였다. 시험 개시 전에, 중앙과 주변은 동물 추적 소프트웨어(Ethovision XT, Noldus, Wageningen, Netherland)를 사용하여 묘사하였다. 상기 소프트웨어를 사용하여 이동 거리뿐만 아니라 중앙 대 주변에서 소요된 시간의 양을 결정하였다.

[0490] **[0398]** 퍼즐 박스 작업은 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 문헌(참조: Ben Abdallah *et al.* (2011) Experimental neurology 227, 42-52)에 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다. 마우스는 목표 박스(15x28x28cm)에 진입하기 위해 3분을 소요하였다. 마우스가 목표 박스에 진입하지 않으면 실험자의 격려와 지시를 받았다. 덮여진 목표 박스는 조명이 잘 비치지 않은 영역(58x28x28cm)에 인접했있다. 목표 박스 진입은 출입구로 개시하여(시험 1) 지하통로(시험 2, 3, 4)로 변경한 후 이어서 지하통로를 톱밥으로 채우고(시험 5, 6, 7) 채워진 지하통로는 작은 직사각형 판지 조각으로 덮었다(시험 8, 9). 각각의 마우스는 3일의 기간 동안 9개 시험을 진행하였다. 첫째 날은 시험 1~3으로 이루어지고, 둘째 날은 시험 4-6으로 이루어지고, 시험 7-9는 3일차에 일어났다.

[0491] **[0399]** 고차 인지 기능을 시험하기 위해 제한된 시간 내에 증가하는 어려움의 탈출 과제를 마우스가 완료해야 하는 문제 해결 시험을 수행하였다. 퍼즐 박스 영역은 PLEXIGLAS™ 흰색 박스가 검정 장벽으로 시작 및 목표 영역의 두 구획으로 나누어지도록 디자인되었다. 마우스를 밝게 조명된 시작 구역에 도입하고 좁은 지하통로를 통해 접근할 수 있는 더 작게 덮인/어두운 목표 구역을 선호하는 것으로 관찰되었다. 시험은 3일 연속으로 분포된 9개의 시험으로 이루어지고, 이 기간 동안 마우스는 목표 구역에 접근하기 위해 지하통로의 장애물을 극복하도록 훈련된다. 장애의 종류는 쉬움부터 중급, 어려움까지 3가지 범위로 나뉜다. 표 12는 시험 1-9 (T1-T9)의 개요이다.

[0492] [표 12]

**시험 개요**

[0493]

| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 | T9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 지하통로 | 부재 | 개방 | 개방 | 개방 | 톱밥 | 톱밥 | 톱밥 | 톱밥 + 덮개 | 톱밥 + 덮개 |

[0494] **[0400]** I278T 마우스를 치료하면 이들의 학습 능력과 인지 능력이 향상되지만 Met 제한은 불안을 증가시킨다. 발달 지연과 다양한 정신과 증상은 HCU 환자들 사이에서 통상적이다. 먼저, 연구 마우스의 불안 수준과 운동 활성을 평가하기 위해 개방 필드 시험을 수행하였다. 표 13 및 표 14는 개방 필드 시험의 결과를 보여준다. 표 13은 마우스 각각의 그룹에 대해 이동한 거리를 보여준다.

[0495] [표 13]

이동 거리 [센티미터 (cm)]

| WT-REG | WT-MRD | I278T-REG | I278T-MRD |
|---|---|---|---|
| 3873 | 5839 | 3326 | 3506 |
| 4665 | 4420 | 3569 | 4854 |
| 4202 | 5906 | 3397 | 4927 |
| 3990 | 6367 | 3684 | 6484 |
| 6161 | 3443 | 2968 | 4511 |
| 3754 | 3243 | 3713 | 6169 |
| 4541 | 4920 | 2860 | 4400 |
| 3668 | 3348 | 2732 | 4210 |
| 4123 | 5442 | 2184 | 4293 |
| 4319 | 5534 | 7454 | 5148 |
| 3960 | 5839 | 5650 | 4896 |
| 3484 | 5747 | 2256 | 4585 |
| 4581 | 6029 | 3033 | 5398 |
| 3954 | 4699 | 3083 | 3100 |
| 3988 | 3676 | 3289 | 5876 |
| 2985 | 4584 | 9967 | 5630 |
| 3606 | 4229 | 3798 | 5362 |
| 3463 | 5140 | 5028 | 5791 |
| | 4912 | 3951 | 7466 |
| | 4667 | 5851 | 4750 |
| | | 4703 | 4405 |
| | | 4522 | |
| | | 3816 | |
| | | 3970 | |
| | | 3155 | |
| | | 5986 | |
| | | 4390 | |

[0496]

[0497] **[0401]** 표 14는 마우스의 각 그룹에 대해 중앙에서 소비한 시간을 보여준다.

[0498] [표 14]

중앙에서 소비한 시간 [초]

| WT-REG | WT-MRD | I278T-REG | I278T-MRD |
|---|---|---|---|
| 82 | 102 | 211 | 275 |
| 157 | 94 | 159 | 150 |
| 175 | 110 | 169 | 159 |
| 110 | 84 | 155 | 170 |
| 188 | 75 | 224 | 199 |
| 381 | 155 | 412 | 110 |
| 170 | 183 | 358 | 139 |
| 204 | 60 | 332 | 142 |
| 180 | 130 | 159 | 113 |
| 290 | 89 | 194 | 167 |
| 199 | 147 | 212 | 165 |
| 249 | 72 | 106 | 151 |
| 248 | 124 | 399 | 199 |
| 221 | 120 | 172 | 220 |
| 162 | 135 | 131 | 103 |
| 244 | 180 | 219 | 130 |
| 170 | 289 | 372 | 179 |
| 208 | 117 | 232 | 64 |
| 128 | 40 | 337 | 141 |
| 254 | 97 | 164 | 233 |
| 268 | | 221 | 164 |
| 182 | | 131 | |
| 348 | | 252 | |
| 85 | | 171 | |
| 187 | | 142 | |
| | | 206 | |
| | | 198 | |
| | | 101 | |
| | | 274 | |
| | | 102 | |
| | | 234 | |

[0499]

[0500] **[0402]** 대조군과 I278T 마우스 둘다의 불안 수준 또는 운동에 대한 20NHS PEG-CBS 처리의 유의적인 영향이 관찰되지 않았다. 그러나 MRD상의 마우스는 유전자형에 관계없이 시험 영역 내 이동 거리가 유의적으로 증가하였고($p<0.01$), 이들이 REG 식이 요법 중의 마우스와 비교하여 영역 중앙에서 덜 시간을 소비함으로써($p<0.001$) 불안이 더 높았다($p<0.001$). 마우스 성별 및 PBS 비히클 또는 20NHS PEG-CBS 주사는 마우스 행동에 어떠한 유의적인 영향을 보여주지 않았지만, REG(채워진 기호) 및 MRD(개방 기호) 식이 요법은 WT 및 I278T 마우스 둘다에서 운동 및 불안 수준의 변화를 유도하였다.

[0501] **[0403]** 둘째, 연구된 마우스의 인지/실행 기능은 퍼즐 박스 시험(도 2)에서 평가되었으며, 여기서 마우스는 밝게 조명된 영역을 탈출하기 위해 어두운 목표 박스에 도달해야한다. 표 15는 WT 및 비히클이 추가된 식이 요법 또는 20NHS PEG-CBS 상에 I278T에서 목표 박스에 도달하는 시간을 보여준다. 상기 순서는 문제 해결 능력 (시험 번호 2, 5 및 8) 및 학습/단기 기억 (시험 번호 3, 6 및 9)의 평가를 가능하게 하였다. 추가로, 다음 날에 반복은 장기 기억의 척도를 제공하였다(시험 번호 4 및 7).

[0502] [표 15]

목표 박스까지의 시간

| 마우스 모델 | 시험 | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| WT (REG+PBS) | 90.3 | 50.0 | 34.8 | 27.5 | 136.7 | 98.7 | 70.4 | 101.9 | 134.5 |
| SEM | 20.4 | 17.8 | 16.4 | 10.3 | 26.4 | 20.9 | 20.6 | 22.0 | 25.0 |
| WT (REG+20NHS PEG-CBS) | 113.6 | 45.5 | 39.3 | 15.8 | 157.6 | 49.9 | 40.3 | 84.3 | 79.4 |
| SEM | 21.2 | 18.5 | 17.1 | 10.7 | 27.5 | 21.7 | 21.5 | 22.8 | 26.0 |
| I278T (REG+PBS) | 107.1 | 77.5 | 63.4 | 42.6 | 237.5 | 174.7 | 166.6 | 195.8 | 201.6 |
| SEM | 16.4 | 14.3 | 13.3 | 8.3 | 21.3 | 16.8 | 16.6 | 17.7 | 20.1 |
| I278T (REG+20NHS PEG-CBS) | 97.5 | 28.3 | 32.3 | 15.8 | 146.4 | 71.2 | 72.7 | 95.1 | 93.5 |
| SEM | 23.2 | 20.3 | 18.8 | 11.7 | 30.1 | 23.8 | 23.5 | 25.0 | 28.5 |
| WT (MRD+PBS) | 80.9 | 25.3 | 24.8 | 10.9 | 100.8 | 18.0 | 40.8 | 52.9 | 47.0 |
| SEM | 24.5 | 21.4 | 19.8 | 12.4 | 31.7 | 25.1 | 24.8 | 26.4 | 30.0 |
| WT (MRD+20NHS PEG-CBS) | 71.2 | 22.6 | 15.2 | 17.2 | 103.8 | 51.2 | 49.5 | 82.0 | 50.3 |
| SEM | 22.2 | 19.3 | 17.9 | 11.2 | 28.7 | 22.7 | 22.4 | 23.9 | 27.2 |
| I278T (MRD+PBS) | 55.2 | 30.9 | 18.5 | 6.5 | 100.6 | 19.7 | 22.2 | 41.9 | 59.6 |
| SEM | 20.4 | 17.8 | 16.4 | 10.3 | 26.4 | 20.9 | 20.6 | 22.0 | 25.0 |
| I278T (MRD+20NHS PEG-CBS) | 44.4 | 29.3 | 15.0 | 9.6 | 123.9 | 55.5 | 55.3 | 98.5 | 98.5 |
| SEM | 26.0 | 22.7 | 21.0 | 13.1 | 33.6 | 26.6 | 26.3 | 28.0 | 31.8 |

[0503]

[0504] **[0404]** 목표 박스에 대한 접근은 연구 그룹에서 9개 시험 각각에서 마우스가 목표 박스에 도달하는 데 필요한 시간(초)을 보여주는 표 15에 지적된 대로 각각의 시험에 의해 더 어려워졌다. 평균 및 평균의 표준 오차(SEM)는 표 15에 제공된 결과에 대해 계산되었다(데이터는 나타내지 않음). 비히클 또는 20NHS PEG-CBS이 추가된 식이 요법상의 대조군 마우스는 인지 장애의 징후 없이 유사하게 수행되었다. 한편, REG 식이 요법 중에 I278T 마우스는 MRD 식이 요법 또는 대조군에 비해 인지 장애를 나타내는 유의적으로 열등한 수행능을 보여주었다($p<0.001$). 20NHS PEG-CBS 처리로, I278T 마우스는 식이 요법 둘다상에서 대조군 마우스 뿐만 아니라 I278T 마우스를 수행하였다.

[0505] **[0405]** REG 식이 요법 및 PBS 주사 상의 I278T 마우스는 MRD 식이 요법 및 PBS 주사 상의 I278T 마우스 및 약물 생성물이 주사된 REG 및 MRD 식이 요법 둘다 상의 마우스와 비교하여 인지 손상이 있는 것으로 관찰되었다. 결론은 작업의 어려움이 증가할 때(즉, 시험 5-10) PBS 주사를 사용한 REG 식이 요법 중의 마우스가 제 시간에 목표 박스에 도달할 수 없는 무능력에 의해 뒷받침되었다. 목표 박스에 도달하는 시간의 유의적인 차이는 그룹 둘다가 약물 생성물을 투여받은 REG 식이 요법 또는 MRD 식이 요법 중에서 마우스 간에 관찰되지 않았다.

[0506] **[0406]** 정신병, 강박 장애, 우울증 및 행동/성격 장애와 같은 많은 심리적 및 정신과적 병태가 HCU 환자에게 통상적이다(문헌참조: Abbott *et al.* (1987) American Journal of Medical Genetics 26, 959-969, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 또한, HCU를 가진 개체는 학습 장애와 낮은 IQ를 갖는 상당한 수의 사례와 함께 많은 발달 및 인지 장애를 갖고 있다(문헌참조: El Bashir *et al.* JIMD reports 21, 89-95, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 본 발명의 마우스의 행동 시험은 이 표현형이 MRD에서 유지되거나 20NHS PEG-CBS로 처리된 대조군 및 I278T 마우스와 비교하여 REG 식이 요법 중에 유지되고 비히클이 추가된 경우 인지 장애를 보여주는 I278T 마우스에서 실제로 복제된다는 것을 보여주었다(도 2 및 표 15). 본 발명자의 지식을 바탕으로, 이것은 CBS 결핍 HCU의 임의의 마우스 모델에서 이러한 표현형과 성공적인 보정에 대한 첫 번째 보고서이다. 추가로, 마우스는 REG 식이 요법 중의 것들과 비교하여 MRD 상에 유지되는 경우 유의적으로 증가된 활성 및 불안을 보여주었다.

[0507] **[0407]** REG 식이 요법 중에 비히클이 추가된 I278T 마우스는 목표 박스에 도달하는데 보다 긴 시간에 의해 지적된 바와 같이 MRD 식이 요법 중에 것들과 비교하여 유의적으로 인지 손상되었다(표 15). 그러나, REG 식이 요법 중에 20NHS PEG-CBS가 주사된 I278T는 MRD 식이 요법 중에 대조군 또는 I278T 마우스와 유사하게 수행하였다(표 15). 채워진 기호가 있는 실선과 개방된 기호가 있는 파선은 각각 REG 및 MRD 식이 요법 중에서 마우스를 지정한다. 모든 플롯의 데이터 포인트는 평균값을 나타내고 오차 막대는 표준 편차(SD)를 보여준다.

[0508] **[0408]** 이들 행동 특성은 유전자형 및 20NHS PEG-CBS 처리에 관계없이 마우스에 영향을 미치기 때문에 HCU와 관련이 없을 가능성이 높다. Met 제한을 포함한 필수 아미노산 고갈은 전두엽(anterior piriform) 피질에서 감지되고 후속 글루타메이트성 신호전달은 마우스 행동에 영향을 미치는 것으로 나타났다(문헌참조: Anthony *et al.*

(2013) Detection of amino acid deprivation in the central nervous system. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 16, 96-101, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 글루타메이트는 중추 신경계의 주요 흥분성 신경 전달 물질로, 운동 증가, 안절부절 및 불안 수준을 설명할 수 있습니다.

[0509] **실시예 10. 이중-에너지 X-선 흡광도(DEXA)**

[0510] **[0409]** GE Lunar PIXImus 스캐너(Lunar Corp., Madison, WI, USA)를 사용하여 마취된 마우스(PBS 중에 60mg/kg 케타민 및 15mg/kg 자일라진의 조합물의 복막내 주사)에서 골 밀도 및 신체 조성을 평가하였다. 마우스는 복부를 아래로 하여 트레이에 놓고 꼬리를 제외하고 목에서 아래로 스캔하였다. 스캔 후, 마우스를 회복시키기 위해 다시 케이지에 넣었다.

[0511] **[0410]** Met 제한은 골 미네랄화 및 신체 조성을 손상시키고, 20NHS PEG-CBS 처리는 REG 식이 요법 중에 I278T의 표현형을 정상화시킨다. HCU 환자에서 관찰되는 임상 증상 중에는 마른 체형, 낮은 체질량 지수 및 골다공증이 있다(문헌참조: Mudd *et al.* (2001) Disorders of transsulfuration. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., and Vogelstein, B., eds) pp. 2007-2056, McGraw-Hill, New York, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 따라서 마우스는 DEXA를 사용하여 이들의 골 미네랄 함량과 신체 조성을 평가하기 위해 연구하였다. 표 16은 DEXA에 의한 골 미네랄화 및 신체 조성의 결과를 보여준다. DEXA 스캔은 마우스가 22주령에 도달한 경우 수행하였다. 표 16은 골 미네랄 함량, 체지방량 및 제지방량을 포함한다.

[0512] [표 16]

DEXA 결과

[0513]

| 파라미터 | BMC [g] | SEM | 체지방량 [g] | SEM | 제지방량 [g] | SEM |
|---|---|---|---|---|---|---|
| WT (REG+PBS) | 0.39 | 0.01 | 4.24 | 0.33 | 16.97 | 0.51 |
| WT (REG+20NHS PEG-CBS) | 0.40 | 0.01 | 6.24 | 0.46 | 17.69 | 0.63 |
| I278T (REG+PBS) | 0.33 | 0.01 | 2.63 | 0.15 | 13.81 | 0.39 |
| I278T (REG+20NHS PEG-CBS) | 0.40 | 0.01 | 5.08 | 0.36 | 17.11 | 0.47 |
| WT (MRD+PBS) | 0.34 | 0.01 | 5.51 | 0.49 | 14.71 | 0.43 |
| WT (MRD+20NHS PEG-CBS) | 0.36 | 0.01 | 4.05 | 0.25 | 14.91 | 0.35 |
| I278T (MRD+PBS) | 0.35 | 0.01 | 6.07 | 0.23 | 16.02 | 0.38 |
| I278T (MRD+20NHS PEG-CBS) | 0.36 | 0.01 | 4.89 | 0.20 | 15.18 | 0.39 |

[0514] **[0411]** REG 식이 요법 중에서 골 미네랄 함량(BMC)은 대조군과 비교하여 비히클 수용 I278T 마우스에서 유의하게 낮았지만(0.33 대 0.39 g, $p<0.001$), 20NHS PEG-CBS를 사용한 처리는 이를 완전히 정상화시켰다(0.4 대 0.4 g, p=ns). MRD 식이 요법 중에, 모든 그룹은 균등한 BMC (0.34-0.36 g)를 보여주었고 이는 REG 식이 요법 중의 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였고($p<0.05$) REG 식이 요법 중에 비히클-주사된 I278T 마우스와 유사하였다. REG 식이 요법 중에서 비히클을 투여받은 I278T 마우스는 다른 그룹의 마우스보다 유의적으로 날씬했으며, 특히 대조군에 비해 적은 지방 조직(2.63 vs 4.24g, $p<0.01$)과 제지방량(13.81 vs 16.97g, $p<0.001$)을 함유하였다. 20NHS PEG-CBS를 사용한 치료는 REG 식이 요법 중에서 I278T 마우스의 신체 조성을 정상화했다. MRD 식이 요법 중에서, 체지방량은 모든 그룹에서 상응하였고, REG 식이 요법 중에서 대조군 또는 20NHS PEG-CBS-처리된t I278T 마우스의 것과 유사하였다. 마찬가지로, 제지방량은 MRD 식이 요법(14.71-16.02g) 상의 모든 그룹에서 유사했지만, 대조군 및 REG 식이 요법 중의 20NHS PEG-CBS 처리된 I278T 마우스에 비해 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

[0515] **[0412]** 골격 비정상 및 연결 조직 결함은 HCU 환자에서 가장 현저한 임상적 증상이다(문헌참조: Mudd *et al.* (2001) Disorders of transsulfuration. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., and Vogelstein, B., eds) pp. 2007-2056, McGraw-Hill, New York, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 흔히 척추 측만증과 관련된 골다공증 및 낮은 체질량 지수는 질환의 중증도에 관계없이 치료를 받지 않거나 늦게 진단된 환자에서 전형적인 발견이다(문헌참조: Mudd *et al.* (2001) Disorders of transsulfuration. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., and Vogelstein, B., eds) pp. 2007-2056, McGraw-Hill, New York; Parrot *et al.* (2000) J Inherit Metab Dis 23, 338-340; 이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). KO 및 I278T에서 골의 미네랄화

감소, 저지방 함량 및 낮은 전체 체중이 밝혀졌지만(문헌참조: Majtan *et al.* (2017) FASEB J 31, 5495-5506; Gupta *et al.* (2009) FASEB J 23, 883-893; Majtan *et al.* (2018) Enzyme Replacement Therapy Ameliorates Multiple Symptoms of Murine Homocystinuria. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 26, 834-844; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨), HCU의 마우스 모델은 그렇지 않다(문헌참조: Majtan *et al.* (2018) Human mutation 39, 210-218; 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 표 16에 나타낸 바와 같이, 이들 발견은 상기 표현형을 정상화하는데 있어서 20NHS PEG-CBS의 효능 뿐만 아니라 비히클을 제공받는 REG 식이 요법 중의 I278T 마우스에서 지지되었다. 한편, 심각한 Met 제한은 유전자형 및 치료에 관계없이 REG 식이 요법 중의 WT 마우스와 비교하여 MRD 상의 모든 마우스에서 골 미네랄화 감소, 제지방량 감소 및 정상 내지 지방량 증가를 유도하였다. 체지방량을 제외하고, MRD는 필수적으로 비히클을 제공받은 REG 식이 요법 중의 비처리된 I278T 마우스와 매우 유사한  전체 사진을 생성하였다. 이전에 MRD 식이 요법은 골 광물화를 포함하는 I278T 마우스에서 HCU 표현형을 보정하는데 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다(문헌참조: Gupta *et al.* (2014) FASEB J 28, 781-790; Kruger *et al.* (2016) Annals of the New York Academy of Sciences 1363, 80-90; 이의 각각은 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨).

[0516] **실시예 11. 높은 Met 식이 요법 중의 HCU 마우스의 죽음의 원인**

[0517] **[0413]** 마우스에 대한 데이터는 HCU 환자에서 심각한 Met 제한이 원치 않는 결과를 초래할 수 있음을 지적하였다. 암컷 HO 마우스는 수컷 HO 마우스가 아닌 식이 요법 kg당 8.2g의 MET를 포함하는 높은 메티오닌 식이 요법(HMD)으로 전환 후 갑자기 죽는 것으로 관찰되었다. 죽음의 원인을 분석하기 위해 성체 암컷 HO 마우스는 HMD에 적용하고, 청소년기 I278T 마우스는 HMD 식이, REG 식이(식이 1kg당 Met 4.0g) 또는 물 중에 REG+0.1/0.2/0.4% Met에 적용하였다. 마우스는 매일 모니터링하였고, 정기적으로 중량을 측정하고 채혈하였다. 새롭게 발견된 사체는 부검 및 조직학적 분석에 적용하였다.

[0518] **[0414]** 마우스는 6개 그룹 (A-F)으로 분류하였다. 그룹 A는 HMD 상의 7마리의 암컷 HO 마우스로 이루어져 있다. 그룹 B는 HMD 상에 1마리의 수컷 I278T 마우스 및 1마리의 암컷 I278T 마우스로 이루어져 있다. 그룹 C는 REG 식이 요법 중의 1마리의 수컷 I278T 마우스 및 1마리의 암컷 I278T 마우스로 이루어지고 0.4% Met가 보충된다. 그룹 D는 REG 식이 요법 중의 1마리의 수컷 I278T 마우스 및 2마리의 암컷 I278T 마우스로 이루어지고 0.2% Met가 보충된다. 그룹 E는 REG 식이 요법 중의 1마리의 수컷 I278T 마우스 및 1마리의 암컷 I278T 마우스로 이루어지고 0.1% Met가 보충된다. 그룹 F는 REG 식이 요법 중의 1마리의 암컷 I278T 마우스 및 2마리의 수컷 I278T 마우스로 이루어져 있다. 총 부검을 위한 대조군에는 4마리의 암컷 HO 마우스. 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷 성인 I278T 및 WT, 2마리의 암컷 청소년 I278T 마우스, 및 3마리의 수컷 및 3마리의 암컷 청소년 I278T 및 WT 마우스를 포함하였다. 모든 부검 대조군은 표준(STD) 식이물 상에 있다.

[0519] **[0415]** HMD 상의 7마리의 암컷 HO 마우스 중 3마리는 11일 내지 18일 사이에 죽었다. 이들 마우스는 번식하지 않았고 체중 감소 또는 체중 증가가 완전히 중단되었다. HMD 상에 있는 동안, Hcy와 Met 둘다는 상당히 증가하는 것으로 관찰된 반면 Cys는 항상 낮게 유지되었다. 예비 조직학적 발견은 퇴행성 난포, 지방의 비누화를 수반한 외분비 췌장, 액포, 심장 근육의 다초점 미네랄화, 죽은 뉴런이 있는 수질, T 림프구의 현저한 아폽토시스를 갖는 흉선 이형성증, 간 지방증, 염증 및 섬유증을 보여주었다.

[0520] **[0416]** I278T 마우스에 대해, 혈장 Hcy는 물에서 보충된 Met를 제공받고 이들의 식이 요법으로부터는 아닌 마우스에서 증가하는 것으로 관찰되었다. 혈장 Met는 Hcy와 유사하게 증가하는 것으로 관찰되었지만 REG 식이 요법 중의 대조군 마우스를 제외하고는 Met 섭취에 의존하였다. I278T 마우스에 대한 예비 조직학적 소견은 섬유증 및 염증이 있는 외분비 췌장, 간 염증, 지방증, 퇴행성 모낭 및 장 상피, T 림프구의 현저한 아폽토시스를 갖는 흉선 이형성 및 십이지장에서의 혈액을 보여주었다.

[0521] **[0417]** 시간 경과에 따른 체중 및 대사물 수준을 측정하였다. 육안 부검 및 광학 조직학도 수행한다.

[0522] **실시예 12. 비-사람 영장류에서 독성 연구(NHP)**

[0523] **[0418]** 본원에 기재된 약물 생성물의 독성은 26주 동안 NHP에 3일마다 1회 및 매일 1회 피하(SC) 투여한 후 결정되었다.

[0524] **[0419]** 8마리의 수컷 및 암컷 시노몰구스 몽키의 그룹은 다음 연구 설계에 따라 비히클 대조군(PBS) 또는 약물 생성물(용량 용적 약 0.4mL/kg)의 SC 주사를 받았다. 이 연구에서 최고 용량은 제형에서 20NHS PEG-CBS의 최대 달성 가능한 농도 및 만성 기준으로 SC 주사에 의해 몽키에게 안전하게 투여될 수 있는 최대 용량 용적에 기초한 가능한 최대 용량을 나타낸다(문헌참조: Gad *et al.* Int J Toxicol. 2016 Mar-Apr;35(2):95-178, 이의 전문

이 본원에 참조로 인용됨). 용량 범위는 예상 치료 용량 범위(0.5 ~ 7 mg/kg)에 걸쳐 있다. 최고 용량은 피하 주사용 제형의 점도, 몽키에서 만성 주사에 대한 권장 용량 및 사람과 비교한 몽키의 예상 노출 시간을 고려하여 결정되었다. 표 17은 처리 그룹 1-6에 대한 세부 사항을 보여준다.

[0525] [표 17]

NHP에서 26주 독성학 연구를 위한 연구 디자인

| 그룹 | 치료제 | 빈도 | 용량 (mg/kg) | 동물의 수(성별 당) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 13 주 | 17 주(회수) | 26 주 |
| 1 | 대조군 | 3 일 마다 | 0 | 3 | 2 | 3 |
| 2 | 낮은 | 3 일 마다 | 2 | 3 | 2 | 3 |
| 3 | 중간 | 3 일 마다 | 7 | 3 | 2 | 3 |
| 4 | 높은 | 3 일 마다 | 10 | 3 | 2 | 3 |
| 5 | 대조군 2 | 매일 | 0 | 3 | 2 | 3 |
| 6 | 투여 반복 | 매일 | 0.5 | 3 | 2 | 3 |

[0526]

[0527] **[0420]** 독성 평가는 사망률; 임상적 관찰; 체중과 체온; 혈압; 질적 식품 소비; 안과 관찰; 신체, 신경 및 호흡기 검사; ECG; 및 임상 및 해부학적 병리학을 기준으로 한다. 대사 산물 및 활성, 보체(CH50), ADA 및 항-PEG 항체, TK 분석을 위해 혈액 샘플을 수거하였다.

[0528] **[0421]** PR 간격, QRS 지속 시간, QT 간격, 보정된 QT(QTc) 간격 또는 심박수의 약물 생성물 관련 변화는 임의의 그룹에 대해 투여 단계 동안 관찰되지 않았다. ECG의 정성적 평가 동안 리듬 이상 또는 정성적 ECG 변화가 약물 생성물에 기인하지 않았다.

[0529] **[0422]** 임의의 예정된 희생에서 임상 병리, 장기 중량, 육안 소견에 대한 약물 생성물 관련 효과는 관찰되지 않았다. 모든 동물은 예정된 희생까지 살아남았다. 추가로, 약물 생성물 관련 임상 관찰; 체중, 체중 증가 또는 혈압의 변경; 또는 신경 행동 관찰, 체온 또는 호흡의 변경이 임의의 용량에 대해 주지되지 않았다.

[0530] **[0423]** 따라서, 20NHS PEG-CBS에 대한 전체 안전성 데이터베이스를 고려할 때 PEG 관련 공포는 사람 연구에서 위험이 될 것으로 예상되지 않는다. 시노몰구스 몽키의 반복 투여 독성학 데이터는 최대 6개월 동안 반복 투여한 후 다양한 CBSDH 마우스 모델의 안전성 데이터와 조합되어 임상 시험에서 사람 개시 용량 및 용량 상승을 지지하기에 적절하고 충분한 것으로 간주된다.

[0531] **[0424]** SC 주사 부위는 상기된 연구 동안에 관찰되었다. 하나 이상의 피하 주사 부위에서 최소에서 약간의 혈관주위 단핵 침윤물이 반복 용량으로 약물 생성물을 주사한 NHP에서 관찰되었다.

[0532] **실시예 13. 사람에서 호모시스틴뇨증의 치료**

[0533] **[0425]** 사람에서 호모시스틴뇨증의 치료를 분석하기 위해, 유전학적으로 확인된 CBSDH 환자에서 이중 맹검, 무작위, 위약 대조 연구가 수행된다. 적격의 환자는 위약에 대해 의약 생성물을 투여받는 환자의 3:1 비율로 등록되고 무작위화한다. 코호트에는 16세에서 65세 사이의 환자가 포함되며, CBSDH의 유전학적 확인과 80 μM 이상의 혈장 tHcy 수준 상승이 있다. 2016년 CBSDH 진단 및 관리 지침에 따르면, tHcy 수준은 가능한 한 정상에 가깝게 (10~15 μM 이하), 특정하게 100 μM 미만으로 유지해야 한다(문헌참조: Morris *et al.* J Inherit Metab Dis. 2017 Jan;40(1):49-74, 이의 전문이 본원에 참조로 인용됨). 80 μM 이상의 내포 기준은 일상 및 분석 변동성을 인정하면서 100 μM의 일반적인 수준을 가진 환자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 30 μM 이상의 tHcy 수준을 사용하여 CBSDH 환자를 정의할 수 있다.

[0534] **[0426]** 약물 생성물은 2mL 1회용 바이알에 채워진 25 ±3mg/mL의 약물 물질의 1mL 멸균 용액으로서 공급된다. 치료는 센티넬(sentinel) 투여로 12주 동안 지속되며 투여 기간과 연구 약물( 약물 생성물 또는 위약) 워시아웃 기간으로 나눈다.

[0535] **[0427]** 연구 약물(약물 생성물 또는 위약)은 SC 주사를 통해 투여된다. 주사는 주사 관리자의 결정에 따라 팔, 복부, 허벅지 또는 엉덩이에서 발생한다. 주사 부위당 최대 용적은 2mL 또는 기관의 표준 절차에 따른다.

[0536] **[0428]** 3개의 연속적인 코호트를 통해 3개의 용량 수준을 순차적으로 평가되도록 계획한다. 각 용량 수준 코호트는 4명의 대상체를 포함한다: 3명의 대상체는 활성 약물(20NHS PEG-CBS)을 투여받도록 무작위화되고, 1명의 대상체는 위약을 투여받도록 무작위화한다(3:1 무작위화 비율 활성/위약). 상기 연구 약물은 매주 간격으로 SC

로 투여된다. 각각의 코호트는 하기의 용량으로 투여된다:

[0537] 코호트 1: 0.33 mg/kg;

[0538] 코호트 2: 0.66 mg/kg; 및

[0539] 코호트 3: 1.0 mg/kg.

[0540] **[0429]** 투여 기간은 연구 약물의 6주 투여 후 연구 약물이 투여되지 않는 6주 기간으로 이루어진다. 하기 프로토콜을 사용하여 연장된 투여 기간이 있는 연구는 12주 이상 동안 수행된다.

[0541] **[0430]** 1일차의 1주 동안, 각각의 대상체는 최소 24시간 동안 입원 환자로 임상 현장에 입원하여 투여 전 및 투여 후 안전성 모니터링(활력 징후, 12-리드 ECG), 안전성 실험실 매개변수를 위한 혈액 샘플링, 약동학(PK)/약력학(PD) 평가를 위한 혈액 샘플링, 항체 수준(투여 전만), 이어서 첫 번째 연구 약물 투여를 진행한다.

[0542] **[0431]** PK/PD 평가를 위한 혈액 샘플링, 활력 징후의 후속 안전성 모니터링, 12-리드 ECG, 부작용(AE) 또는 중증의 부작용(SAE) 평가, 및 안전 실험실 파라미터에 대한 혈액 샘플링도 2일차부터 개시하여 수행한다. 혈액 샘플 및 핑거스틱 혈반 샘플은 현장에서 연구 약물 투여 후 투여 전(0시간) 및 2, 4, 8, 12시간(1일차) 및 24시간(2일차, 퇴원 전) 채취될 것이다. DBS로부터 탐색적 핑거스틱 tHcy 평가 및 PSD 상의 혈반은 현장에서 수행된다. 임상 평가 및 기타 안전성 평가도 수행된다.

[0543] **[0432]** 3일째에, 대상체는 혈액 샘플링 또는 PK/PD 평가(48시간 샘플링), DBS 및 PSD에 대한 탐색적 핑거스틱 tHcy 평가, 및 AE 또는 SAE의 후속 안전성 모니터링, 활력 징후, 안전성 실험실 파라미터를 위한 12개의 리드(lead) ECG 및 혈액 샘플링을 위해 현장으로 복귀한다.

[0544] **[0433]** 4일, 5일, 6일 및 7일에, 대상체는 임의의 AE 또는 SAE, 활력 징후, 및 안전성 실험실 파라미터 및 PK/PD 평가를 위한 혈액 샘플링의 후속 안전성 모니터링을 위해 방문 자격을 갖춘 의료 전문가에 의해 수행된 가정 방문 평가를 거친다(연구 약물 투여 후 72[4일], 96[5일], 120[6일], 및 144[7일] 시간). 임의의 안전성 신호/우려가 나타나는 경우, 대상체는 전체 평가를 위해 예정되지 않은 현장 방문에 참석하도록 지시받는다.

[0545] **[0434]** 2주 내지 5주 동안에, 각각의 대상체는 방문 4, 5, 6 및 7일차에 연구 약물 투여, 안전성 평가, 면역원성(3주차에만), PK/PD 혈액 샘플링, 심부 뇌 자극(DBS) 및 전력 스펙트럼 밀도(PSD)에 대한 탐색적 핑거스틱 평가를 위해 매주 현장 방문을 갖는다.

[0546] **[0435]** 워시아웃 기간은 연구 약물 투여 기간 완료 시 36일째에 개시한다. 안전성 모니터링 및 연속 PK/PD 평가는 상기 기간 동안 수행된다. 각 대상체는 방문 의료 전문가의 매주 가정 방문을 경험하고 6주간의 워시아웃이 끝나면 한 번의 현장 방문을 경험한다. 상기 기간동안에 평가는 안전성, 활력 징후 및 통상의 연구 시험을 위한 혈액 샘플링, PK, PD 및 면역원성의 모니터링을 포함한다. DBS의 탐색적 핑거스틱 평가와 PSD 상의 혈반은 워시아웃 기간의 마지막 방문 시 임상 현장에서 수행되었다.

[0547] **[0436]** 안전성과 관련하여 주 1회 0.33mg/kg의 개시 용량은 NHP 내 NOAEL(즉, 3일마다 10mg/kg)보다 약 30배 낮다. 1.0 mg/kg의 계획된 최고 용량은 NHP에서 NOAEL보다 약 10배 낮다. 따라서 프로토콜에서 계획된 용량 범위는 큰 안전성 여유를 제공한다.

[0548] **[0437]** 안전성 고려사항에 추가하여, 마우스, 래트 및 NHP로부터의 PK/PD 데이터의 외삽은 계획된 용량 및 간격이 CBSDH 환자에서 치료적으로 적절한 혈장 농도를 달성할 것임을 지적한다. 마우스에서 약리학 연구는 단일 주사 후 약 50mU/μL의 노출이 효과적이었음을 지적한다. 사람에서 PK/PD 외삽법은 0.33mg/kg의 용량을 매주 2회 또는 매주 0.66mg/kg의 용량을 투여하면 6주 투여 후에 효과적인 수준에 도달할 것임을 지적한다. 사람에서 외삽된/예측된 반감기는 175 시간 또는 7.3 일이다.

[0549] **실시예 14. 예비 단계 1/2 임상 연구 결과**

[0550] **[0438]** 진행 중인 단계 1/2 연구로부터 예비 결과 - 총 호모시스테인(tHcy) 수준이 80μM 이상인 CBS의 유전학적 결핍에 2차적인 HCU의 기록된 이력이 있는 12세에서 65세 사이의 환자를 조사하여-(실시예 13에 상세히 기재된 바와 같이) 소아 및 성인 환자 둘다에서 최대 1년, 최대 6개월, 최대 45일 또는 최대 1개월의 기간 동안 노출과 함께 주당 1회 또는 2회 투여되는 1mg/kg 용량의 20NHS PEG-CBS의 효능을 확인한다. 연구는 낮은 안전성 위험과 낮은 면역원성을 가진 우수한 안전성 프로필을 보여준다. 예를 들어, 대부분의 TEAE (치료 응급 부작용)는 경미하지만 소수는 중등도였다. 한 환자에서 1건의 SAE(유의적인 부작용)만 기록되었고; 상기 환자는 20NHS PEG-CBS의 1회 용량을 놓쳤고 문제 없이 투여를 재개하였다.

[0551] **[0439]** 경미한 면역원성이 관찰되었다. 관찰된 항-약물 항체(ADA) 역가는 최대 역가가 4,100인 환자 1명을 제외하고는 투여 전 역가와 유사하였다. 또한, 검출된 항체는 PK 결과를 기반으로 하여 중화되지 않는다. 관찰된 항-PEG 역가는 투여전 역가와 유사하였고 마찬가지로 PK 결과에 기초하여 비-중화이다. 이러한 결과는 3개월까지 1,000,000의 ADA 역가 및 1개월까지 ~10,000의 항-PEG 역가를 보여주는 비교 효소 요법(예를 들어, Palynziq)보다 우수하다. 다른 효소 요법은 통상적으로 ≥ 1,000의 역가를 관찰한다.

[0552] **[0440]** 예비 결과는 4개의 비맹검 코호트 중 3개(코호트 4개 중 1개는 위약 대조군을 투여받았고 어떠한 활성 약물 생성물을 투여받지 않음)에서 1주차 및 6주차(주당 1회 또는 2회 1 mg/kg으로)에 기준선 tHcy 수준에서 최대 약 50%의 평균 감소를 입증한다. 1주차 및 6주차 동안의 하루 샘플링은 4개 중 3개의 비맹검 코호트(4개 중 1개 코호트가 위약 대조군을 투여받고 활성 약물 생성물을 투여받지 않음)에서 기준선 tHcy 수준으로부터 약 40-60% 감소를 보여주었다. 관찰된 최대 효능(4개 비맹검 코호트 중 1개)은 2/3 환자의 tHcy 수준이 약 100 μM에서 약 200 μM의 기준선 수준에서 약 50 μM로 하강하였다. 20NHS PEG-CBS 수준은 환자 기준으로 tHcy 감소와 밀접하게 상관관계가 있다. 업데이트된 모델은 주 2회 용량(1 또는 1.5mg/kg)이 관찰된 최대 효능의 두 배 이상이고 정상 상태 수준의 tHcy를 달성할 것으로 예측한다.

[0553] **[0441]** 결과는 상기 방법에 따라 대상체에게 투여된 20NHS PEG-CBS가 혈장에서 활성 및 안정하고(고유 효소와 같지 않게) 기저 병리와 무관하게 상승된 tHcy 수준(세포내 및 혈장)을 극적으로 감소시킴을 입증한다.

[0554] **<u>실시예 15. 20NHS PEG-CBS는 호모시스틴뇨증의 마우스 모델에서 기준선의 식이 완화 및 베타인 중단을 가능하게 한다</u>**

[0555] **[0442]** 호모시스틴뇨증의 마우스 모델에서 전임상 연구는 20NHS PEG-CBS를 사용한 장기간 연속 치료(예: 최대 16주)가 식이 요법에 관계없이 tHcy 수준을 유의적으로 감소시키고/시키거나 정상화함을 입증한다. 도 3에 도시된 바와 같이, 표준 메티오닌 식이 요법("STD")상의 HO 마우스는 베타인의 투여에도 불구하고 상승된 tHcy 수준(예를 들어, 100 μM 초과)을 가졌다. 20NHS PEG-CBS의 투여는 베타인을 중단한 후에도 tHcy 수준을 극적으로 감소시키거나 정상화하였다.

[0556] **[0443]** HO 마우스를 사용하여 사람 대상체에서 호모시스틴뇨증의 주요 생화학적 지표를 개괄한다. 수컷 및 암컷 HO 마우스 둘다를 사용하고, 달리 지적되지 않는 경우 표준 완전 식이 요법(STD, Teklad 완전 식이 2920X, 5.0g/kg Met 및 3.0g/kg 시스틴 포함) 상에 유지하였다. 마우스를 A, B 및 C의 세 그룹으로 나누었다. 그룹 A는 10주차까지 STD 상에 유지하였다. 그룹 B와 C는 각각 10주차까지 높은 Met 식이 요법(HMD, Met-풍부 아미노산 정의된 식이 TD.01084, 8.2g/kg Met 및 3.5g/kg 시스틴)과 Met 제한 식이 요법(MRD, Met-결핍 아미노산 정의 식이 요법 TD.110591, 0.5g/kg Met 및 3.5g/kg 시스틴) 상에 유지하였다. 3개의 그룹은 추가 치료 없이 처음 2주 동안 이들 식이 요법 중에 유지하였다. (이 기간 동안 그룹 B에서의 죽음은 연구를 완료하기 위해 추가 마우스를 등록해야 했다.) 마우스는 식이 요법을 계속했고 3주에서 5주까지 베타인(음용수에 2% w/v)을 제공하였다. 식이 요법과 베타인을 계속하는 마우스도 6주차부터 20NHS PEG-CBS(7.5mg/kg SC, 주당 3회)로 치료하였다. 그런 다음 베타인은 9주차부터 중단하였고, 20NHS PEG-CBS 치료는 연구 종료(16주차)까지 계속하였다. 식이 요법 전환은 다음과 같이 수행하였다: 전환 #1 (11주 - 12주), 그룹 A, B 및 C는 각각 HMD, MRD 및 STD로 전환됨; 전환 #2 (13주 - 14주), 그룹 A, B 및 C는 각각 MRD, STD 및 HMD로 전환됨; 전환 #3 (15주 - 16주), 그룹 A, B 및 C는 각각의 이들의 본래의 식이 요법 STD, HMD 및 MRD로 다시 전환됨. 혈액은 연구 전반에 걸쳐 주당 1 내지 3회 수거하였고, Hcy, Met 및 Cys를 포함하는 대사산물의 혈장 수준을 검정하였다. Capiject T-MLHG 리튬 헤파린 튜브(Terumo Medical Corporation, Somerset, NJ, USA)로의 턱밑 샘플링을 위해 설계된 1회용 란셋을 사용하여 의식 연구 동물의 턱밑 정맥에서 혈액 샘플을 수거하였다. 1,200 x g에서 10분 동안 원심분리한 후 혈액 샘플에서 혈장을 수거하고 -80℃에서 1.5 ml 튜브에 저장하였다. 혈장 아미노티올 (총 Cys 및 Hcy) 및 나머지 아미노산, 및 SAM 및 SAH는 문헌(참조: Arning and Bottiglieri, Clinical Applications of Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis, U. Garg, Editor. 2016, Springer: Seacaucus, NJ. p. 255-262, 이의 내용물이 이들의 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같이 LC-MS/MS에 의해 측정하였다. 요인 ANOVA에 이어 Tukey의 HSD 사후 시험을 적용하였다. $p < 0.05$의 값은 통계학적으로 유의적인 것으로 고려되었다.

[0557] **[0444]** 도 3에 나타낸 바와 같이, 3, 혈장 Hcy 수준은 각 식이의 Met 수준에 따라 STD 마우스의 기준선 수준(~95-166 μM)에서 급격하게 변화되었다. 따라서, MRD 단독으로 전환시킨 후, Hcy 수준은 ~26-56 μM로 감소한 반면, 상기 HMD는 Hcy 수준을 400 μM 초과로 증가시켰다. 베타인은 MRD 상의 마우스에서 Hcy 수준(≤16 μM)을 정상화시켰지만, 단지 부분적으로 효과적이었고 각각 HMD 및 STD 상에서의 것들에서는 비효과적이었다. 상기 관찰은 베타인과 Met 제한의 조합으로 HCU를 치료하는 관행을 지지하였다. 여전히 베타인을 투여받는 HMD 또는

STD 상의 마우스에서, 20NHS PEG-CBS의 도입은 Hcy 수준을 ~22-55μM으로 급격하게 감소시켰다. 중요하게, 베타인이 중단되었지만 20NHS PEG-CBS 치료가 계속되었을 때, 이들 낮은 Hcy 수준은 안정적으로 유지되었고 MRD에 대한 마우스의 수치는 정상화된 상태로 유지되었다. 더욱이, 혈장 Hcy는 또한 MRD 상의 사람들이 STD 또는 HMD로 전환된 경우에도 식이 전환 시 이러한 낮고 안정적인 수준으로 유지되었다.

[0558] **[0445]** 혈장 Met 수준은 HMD 상의 HO 마우스에서 약 2배 증가하였으며 베타인을 추가하면 훨씬 더 중증으로 최대 7배까지 증가하였다(데이터는 표시되지 않음). 이것은 또한 Hcy 상승과 함께 그룹 B의 높은 사망률에 기여했으며 암컷에서 악화되었다. HMD 상의 마우스에서 베타인으로 관찰된 크게 상승된 Met는 디메틸글리신(DMG)과 함께 Met가 베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(BHMT)에 의해 촉매되는 베타인과 Hcy 간의 반응 생성물이라는 사실과 일치하였다. 따라서, DMG 수준은 또한 이 그룹에서 BHMT 기질 Hcy의 증가된 가용성과 일치하여 그룹 B에서 가장 높았다.

[0559] **[0446]** 베타인에 첨가되었을 때, 20NHS PEG-CBS 처리는 그룹 B의 혈장 Met 수준을 그룹 A 및 C의 것과 유사한 값으로 감소시키는 데 매우 효과적이었다. 다시 말하지만, 이러한 낮은 Met 수준은 베타인 중단 및 후속 식이 전환 후에도 20NHS PEG-CBS 처리에 의해 유지되었다. 또 다른 흥미로운 관찰은 20NHS PEG-CBS 치료가 베타인과 함께 투여되었을 때 그룹 B의 DMG 수준이 약 절반으로 떨어졌다는 것이다(데이터는 표시되지 않음). 이것은 20NHS PEG-CBS가 Hcy에 대한 베타인과 함께 효과적으로 완료했음을 시사하였다.

[0560] **[0447]** HO 마우스에서 혈장 Cys 수준이 WT 대조군(~200μM)의 대략 절반이지만, 이들은 MRD 상의 HO 마우스에서는 완전히 정상화되었다(~226-236μM)(데이터는 나타내지 않음). 베타인 단독은 어떤 그룹에서도 Cys 수준을 개선하지 않았지만 HMD(~152-219μM) 및 STD(~156-195μM) 상의 마우스에서 완전히 정상화된 Cys 수준에 부분적으로 20NHS PEG-CBS를 추가하였다. 연구 전반에 걸쳐 상당한 변동이 있었지만 20NHS PEG-CBS에 의해 정상화된 Cys 수준은 베타인 제거 또는 후속 식이 요법 전환에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 그것의 촉매 활성과 일치하게, 20NHS PEG-CBS는 모든 그룹에서 Cth 수준을 상승시켰고, 특히 STD 또는 HMD에서 시작하는 그룹은 많은 변동이 있지만(데이터는 표시되지 않음) Hcy와 Cth 수준 사이의 상관 관계를 시사한다.

[0561] **[0448]** 또한 S-아데노실메티오닌 (SAM) 대 S-아데노실호모시스테인 (SAH)의 비율을 모니터링하였다(데이터는 나타내지 않음). 다른 그룹과 비교하여 SAM/SAH 비율은 그룹 C 내 마우스에서 실질적으로 보다 높았고 20NHS PEG-CBS 처리로 다소 감소하였다. 그룹 A와 B에서 20NHS PEG-CBS 처리는 SAM/SAH 비율에서 적당한 증가를 유발하였다. 20NHS PEG-CBS 처리 동안 모든 그룹에서 SAM/SAH 비율은 유사하였지만 식이 요법 전환 전 그룹 C에서 약간 더 높았다.

[0562] **[0449]** 전반적으로, 베타인의 존재 하에, 20NHS PEG-CBS 처리는 HMD가 공급된 HO 마우스에서 혈장 Met 수준 및 HMD 또는 STD가 공급된 마우스에서 Hcy 수준을 실질적으로 감소시켰다. MRD 상의 HO 마우스에서 베타인 단독으로 혈장 Hcy를 정상화하기에 충분하였다. 베타인이 아닌 20NHS PEG-CBS는 STD 또는 HMD 상의 마우스에서 Cys 수준을 정상화시켰다. 베타인 제거 시 20NHS PEG-CBS만으로도 Met 섭취가 식이 요법 전환에 의해 변화된 경우에도 이러한 대사 개선을 유지하기에 충분하였다. DMG 수준에서의 변화와 함께 이러한 관찰은 베타인 보충이 20NHS PEG-CBS와 동시 투여될 때 추가적인 이점을 제공하지 않음을 지적하였다.

[0563] **실시예 16. 동결건조된20NHS PEG-CBS 제형의 제조 및 분석**

[0564] **[0450]** (i) 동결건조 시간의 감소, (ii) 재구성 시간의 감소, (iii) 점도의 감소, 및/또는 (iv) 20NHS PEG-CBS의 탈-페길화의 감소를 초래하는 제형을 확인하기 위해 20NHS PEG-CBS의 다양한 제형을 시험하였다. 하기된 바와 같은 25mM 인산칼륨, pH 7.5의 5% 수크로스 중 25.4mg/ml 농도의 20NHS PEG-CBS를 사용하여 표 18에 기재된 제형을 제조하였다.

[0565] [표 18]

동결건조된 제형

| 제형 번호 | 완충액 | 부형제 1 | 부형제 2 | pH | 특성 |
|---|---|---|---|---|---|
| F1 | 15mM K-포스페이트 | 8% 트레할로스 | - | 7.5 | 대안적 당-상이한 케이크 구조 및 건조 동력학-재구성 시간 및 공정 시간 감소의 기회에 대한 효과 |
| F2 | 15mM K-포스페이트 | 4% 만니톨 | - | 7.5 | 결정 케이크 형성제 -상이한 케이크 구조 및 건조 동력학- 재구성 시간 및 공정 시간 감소 기회에 대한 효과 |
| F3 | 15mM K-포스페이트 | 8% 트레할로스 | 0.01% (w/v) PS80 | 7.5 | 재구성 시간에 대한 효과, 동결 거동에 대한 효과 |
| F4 | 15mM K-포스페이트 | 260 mM 아르기닌 | - | 7.5 | 대안적 케이크 형성제/안정화제 및 점도 감소제 |
| F5 | 15mM K-포스페이트 | 208 mM 아르기닌 | 52 mM 페닐알라닌 | 7.5 | 대안적 케이크 형성제/안정화제 및 점도 감소제, 공정 시간 감소의 기회 |
| F6 | 15mM K-포스페이트 | 1% 트레할로스 | 4% 만니톨 | 7.5 | 반-결정 케이크, 재구성 시간 및 공정 시간 감소 기회에 대한 효과 |
| F7 | 15mM K-포스페이트 | 6% 트레할로스 | 100 mM 아르기닌 | 7.5 | 대안적 케이크 형성제/안정화제 및 점도 감소제, 반-결정 케이크 |

[0566]

[0567] **[0451] 상기 활성** 제형은 동결건조 전(본원에서 "T-액체"로 지칭됨) 및 동결건조 이후(본원에서 안정성 연구의 "T-Lyo" 및 "T0"로 지칭됨) 분석되었다. 그 후, 동결건조된 재료는 5℃, 25℃/60% r.h 및 40℃/75% r.h에서 최대 3개월 동안 안정성 연구에 적용하였다. 동결건조된 제형의 안정성은 또한 1개월 (T1M)에 시험하였다.

[0568] **A. 샘플 제조**

[0569] **[0452]** 제형 제조 3일 전에 20NHS PEG-CBS(25mM의 인산칼륨, 5% 슈크로스, pH 7.5에서 25.4mg/ml)를 냉동고(-80°C)에서 꺼내어 5°C의 냉장고에서 72시간 동안 해동시켰다. 해동 후, 25mM 인산칼륨, 5% 슈크로스, pH 7.5 중 25.4mg/ml의 20NHS PEG-CBS를 약한 소용돌이에 의해 균질화하였다. 제형은 20-kDa 컷오프 투석 카세트 및 각각 ≥ 1:45(교환당 완충액 3,300ml)의 용적비로 3회 완충액 교환을 사용하여 24시간 동안 5℃에서 제어된 조건하에서 투석에 의해 제조하였다. 총 투석 시간 3시간 및 6시간 후에 완충액을 교환하였고, 마지막 투석 단계는 밤새 수행하였다. 투석 후, 제형을 투석 카세트로부터 제거한 다음 pH, 삼투압 농도 및 단백질 농도를 분석하였다. 모든 제형에 대해, 단백질 농도는 20 - 30 mg/ml의 사양 내에 있는 것으로 밝혀졌다. 표 18에 기재된 제형 F3에 대해, 10%(w/v) 폴리소르베이트 80(PS80)의 스톡 용액을 투석된 물질에 스파이킹하여 0.01%(w/v)의 최종 농도를 달성하였다.

[0570] **B. 동결건조**

[0571] **[0453]** 제형의 동결 건조는 엡실론 2-12D 파일럿 규모 동결 건조기(RND-FD02, Martin Christ, Germany)를 사용하여 수행하였다. 1차 건조 개시 전, 모든 제형은 하나의 동결 건조기에서 배합하였다. 동결 건조 공정 중 진공은 정전용량 게이지로 제어되었다. 최적화된 동결건조 공정은 표 19에 요약한다. 바이알의 5℃로의 평형화 후, 바이알은 -45℃로 동결시키고, 추가로 5시간 동안 -45℃에서 평형화하였다. 선반 온도는 1차 건조에서 31시간 동안 -15℃로 설정하였다. 2차 건조는 2.5 시간동안 40℃의 선반 온도에서 수행하였다. 동결건조 공정의 말기에, 챔버는 질소로 800 mbar로 통기시키고, 바이알은 선반을 들어올려 마개로 막았다. 마개로 막은 후, 챔버는 질소를 사용하여 기압으로 통기시켰다.

[0572] **C. 동결건조된 제형의 재구성**

[0573] **[0454]** 동결건조된 생성물은 고도의 정제수를 사용하여 재구성하였다. 재구성 용적은 동결건조 동안의 중량 손실로서 중량 측정으로 결정되었다. 재구성 시간은 액체가 첨가된 후 동결건조된 생성물의 완전한 재구성을 달성하는 시간으로서 측정하였다. 재구성 거동은 주로 발포와 관련하여 판단되었다. 안정성 연구 전반에 걸쳐 모든 제형에 대한 재구성 시간을 결정하였다. 전반적으로 재구성 시간은 54초 내지 4.75분이었다. 제형 사이에, 완전한 재구성에 도달하는 데 더 많은 시간이 필요한 제형 F5를 제외하고 재구성 시간 사이에 실질적인 차이가 관찰되지 않았다. 추가로, 모든 제형은 중간 내지 강한 수준의 필적할만한 거품 형성을 보여주었다.

[0574] **D. 동결건조된 제형의 분석**

[0575] **[0455]** 안정성 연구의 T0에서 동결건조된 제형의 광학적 외관을 평가하였다. 고려한 파라미터는 케이크의 조밀함, 바이알 벽과의 접촉, 케이크의 형태, 색상 및 전체 외관을 포함하였다. 케이크 구조의 모든 제형은 천연적으로 조밀하고 갈색을 띤 성질을 띠며 양호한 외관을 보여주었다. 또한, 결정 케이크의 약간의 수직적 수축이 관찰되었다. F1, F3 및 F6은 케이크 내에서 약간의 작은 균열을 보인 반면, 다른 모든 제형의 케이크는 손상되지 않은 것으로 나타났다. 전반적으로, 제형 간에 큰 차이가 관찰되지 않았다. 케이크의 광학적 외관은 시험된 저장 조건에 대한 안정성 연구 1개월 후에도 변하지 않았다. 3개월 후에 제형 하위 세트(F1, F3 및 F7)의 광학적 외관 평가에서도 광학적 외관의 변화가 나타나지 않았다.

[0576] **[0456]** 2,000 - 3,750lux에서, 유럽 약전(9판, 모노그래프 2.9.20)에 따라 흰색 배경 앞에서 5초 동안 및 검정색 배경 앞에서 5초 동안 부드러운 수동 방사형 교반 하에 바이알을 가시 입자의 존재 또는 부재에 대해 검사하였다. 모든 제형은 가시적인 단백질성 입자가 없는 것으로 밝혀졌고 강렬한 착색을 특징으로 하였다. 또한, 일부 샘플은 점성 용액으로 분류되거나 기포를 포집하는 경향을 보였다.

[0577] **[0457]** 제형의 pH 값은 소형 샘플 용적에 대한 정상 이온 강도 전극(InLab™ Micro Pro ISM)을 사용하여 눈금이 매겨진 pH 측정기 (SevenCompact™ SC S210-B, Mettler Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였다. 동결건조 전뿐만 아니라 안정성 연구 과정 전반에 걸쳐 모든 제형에 대해 pH 분석을 수행하였다. 모든 샘플에 대해 pH 7.5 ± 0.3의 사양 범위 내에서 pH 값을 측정하였다.

[0578] **[0458]** 샘플의 삼투압 농도는 Gonotec OSMOMAT 3000 삼투압측정기(Gonotec GmbH, Germany)를 이용하여 어는점 내림법으로 측정하였다. 동결건조된 제형의 삼투압 농도는 20NHS PEG-CBS의 삼투압 농도 값(25mM 인산칼륨, 5% 수크로스, pH 7.5중 25.4mg/ml)과 비교하였다. 동결건조 전후에 유사한 삼투압 농도 값을 수득하였다.

[0579] **[0459]** 모든 제형 중의 단백질 농도는 동결건조 전뿐만 아니라 안정성 연구 전반에 걸쳐 UV 분광법으로 분석하였다. 수득된 모든 단백질 농도는 20 - 30 mg/ml의 사양 범위 내에 있었다. 동결건조 전과 후의 단백질 농도를 비교할 때 모든 제형에 대한 ≤5%의 차이가 관찰되었다. 따라서 단백질 농도와 삼투압 농도 둘다의 분석은 동결건조 동안에 수분 손실의 정확한 결정을 지적한다.

[0580] **[0460]** 점도 측정은 Kinexus ultraplus 유동계(Malvern Instruments, UK)를 사용하여 이루어졌다. 제형의 결정된 점도는 ~ 18 내지 27 mPa*s표 25의 범위에 있었다. 단축 시간 또는 온도의 점도에 대한 영향은 관찰되지 않았다. 그러나, 제형을 비교할 때 실질적으로 상이한 점도가 측정되었다. UV 분광법의 결과와 점도 값을 비교할 때, 용액 점도와 단백질 농도의 상관 관계가 분명하였다.

[0581] **[0461]** 제형의 탁도는 NEPHLA 탁도계(Dr. Lange, Germany)를 사용하여 측정하였다. 전반적으로, 안정성 연구 과정에서 뿐만 아니라 제조 후 모든 제형에 대해 낮은 탁도가 수득되었다. 제형 간의 실질적인 차이는 관찰되지 않았다. 2-8℃에서 저장된 2개의 샘플(F2 및 F4)은 25℃ 또는 40℃에서 저장된 각 샘플보다 더 높은 탁도를 보여주었다. 이들 증가된 값은 측정 아티팩트(artfact)일 가능성이 높다.

[0582] **[0462]** 액체 제형의 색상은 분광 비색계(LICO 690 Professional, UK)를 사용하여 평가하였다. 시점 및 제형 조성에 관계없이 모든 샘플은 적색 스케일 내에서 R1에 가장 가까운 것으로 분류되었다.

[0583] **[0463]** 마이크로-유동 이미지화(Micro-Flow Imaging)(MFI)를 사용하여 실리콘 오일 소적 및 단백질 입자의 구분뿐만 아니라, 준-가시적 입자 (~1-100㎛)의 정량화 및 가시화를 수행하였다. MFI에 의해 결정된 입자 ≥ 2 ㎛의 농도를 결정하였다. 전반적으로, 모든 제형, 저장 조건 및 시점에 대해 매우 낮은 입자 농도가 결정되었다. 안정성 연구 과정에서 입자 함량의 변화와 관련하여 명확한 경향은 동정되지 않았다.

[0584] **[0464]** 고성능 크기 배제 크로마토그래피(HP-SEC)는 제형 제조 후 뿐만 아니라 동결건조된 샘플의 재구성 후 모든 안정성 시점에서 수행하였다. 전반적으로, 모든 샘플은 안정성 연구 전반에 걸쳐 높은 PEG-CBS 함량을 보여주었고 비-페길화된 분자 함량의 증가를 보여주지 않았다.

[0585] **[0465]** 역상 고성능 액체 크로마토그래피는 또한 모든 샘플에 대해 수행하였다. 크로마토그램에서 식별 가능한 10개의 피크가 확인되었으며 체류 시간이 증가함에 따라 피크 1에서 피크 10까지 명명되었다. 여기서, 피크 6-9의 상대적 면적의 감소 및 피크 1-4의 상대적 면적의 증가는 관찰될 수 있었다.

[0586] **[0466]** 진공하에서 동결된 제형의 거동은 동결 건조 현미경(FDSC 196, Resultec, Germany)에 의해 분석하였다. 동결 건조 현미경(FDM) 측정은 붕괴 개시 온도(Tc,on)에 따라 동결건조 공정 파라미터를 조정하기 위해 T-액체

(동결건조 전 제형)에서 수행되었다. 결정된 Tc,on 값은 -22℃ 내지 -14℃ 범위에 있었다. 따라서, 동결건조 수행의 1차 건조 동안 선반의 설정 온도에 해당하는 -25℃ 이상의 온도에서 제형 중 어느 것도 붕괴를 보여주지 않았다.

[0587] **[0467]** 요약하면, 2-8℃, 25℃ 및 40℃에서 최대 3개월 동안 저장 후 재구성 시간, 점도 및 안정성과 관련하여 7개의 제형을 스크리닝하였다. 케이크 재구성 시간 및 샘플 점도와 관련하여, 제형 간에 또는 분석적 시점 간에 어떠한 고려될 수 있는 차이가 보이지 않았다. F5의 생성물 케이크에 대해, 다른 후보와 비교하여 실질적으로 더 긴 재구성 시간이 측정되었다. 2-8 ℃ 또는 25 ℃에 저장된 모든 샘플은 전반적으로 양호한 안정성을 보여주었다. 그러나 40 ℃의 저장 조건에서 제형 간에 약간의 차이가 밝혀졌다. 예를 들어, HP-SEC 분석은 1개월 동안 저장 후 피크 1의 증가된 상대적 함량과 조합된 제형 F2, F4 및 F6에 대한 PEG-CBS의 상대적 함량 감소를 보여주었다. RP-HPLC 분석은 제형 F2 및 F5의 피크 1-4의 상대 면적의 증가와 함께 피크 6-9의 상대 면적의 감소를 보여주었다. 따라서, 동결 동안 어닐링 단계를 거친 샘플은 동결 동안 어닐링 단계가 없는 샘플보다 전체적으로 덜 안정한 것으로 나타났다.

[0588] **[0468]** 시험된 제형 중 F1, F3 및 F7 제형은 모든 저장 조건에서 매우 높은 안정성을 보여주었다(몇 가지 예외와 함께). 종합하면, 제형 F1, F3 및 F7은 이들 중에서 그리고 모든 분석 시점에서 비교적 양호한 결과를 보여주었다.

[0589] **실시예 17. 동결건조 공정 파라미터의 분석 및 최적화**

[0590] **[0469]** 15mM K-포스페이트, 8% 트레할로스, pH 7.5로 이루어진 실시예 16에 기재된 F1 제형을 사용하여 동결건조 공정을 최적화하였다. 최적화된 동결건조의 예상 결과에는 (i) 케이크 용융 없이 동결건조 주기 시간 감소, (ii) 재구성 시간 감소 및 (iii) 20NHS PEG-CBS의 탈-페길화 감소를 포함한다.

[0591] **[0470]** 동결건조 공정 최적화는 상이한 공정 파라미터에서 3회의 연속 동결건조 주기 동안 수행되었다. 특히, (i) 1차 건조(PD) 시간, (ii) PD 온도 및 (iii) 2차 건조(SD) 시간은 사이클 간에 다양하였다. 사이클 1의 목적은 1차 건조 파라미터를 최적화하는 것인 반면, 사이클 2의 초점은 2차 건조 특징 분석이고, 사이클 3은 공정 시간을 48시간 미만으로 감소시키는 것을 목적으로 하였다.

[0592] **[0471]** 3개의 연속 동결건조 사이클은 엡실론 2-12D 파일럿 스케일 동결-건조기에서 수행하였다. 챔버 압력은 정전용량 게이지(capacitance gauge)에 의해 제어하고, 진공 펌프 및 제어된 질소 투여에 의해 조절된다.

[0593] [표 19]

**최적화된 동결건조 공정 파라미터**

[0594]

| 단계 번호 | 단계 | 시간 (hh:mm:ss) | 온도 (℃) | 압력 (mbar) | 총 시간 (h) | 램프 (℃/min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 부하 | 0:00:00 | 5 | 1000 | 0.0 | |
| 2 | 5℃에서 평형화 | 1:00:00 | 5 | 1000 | 1.0h | |
| 3 | 동결 | 1:40:00 | -45 | 1000 | 2.7 | 0.50 |
| 4 | 동결 | 5:00:00 | -45 | 1000 | 6.7 | |
| 5 | 1차 건조 | 0:30:00 | -45 | 0.1 | 7.2 | |
| 6 | 1차 건조 | 1:00:00 | -15 | 0.1 | 8.2 | 0.50 |
| 7 | 1차 건조 | 31:00:00 | -15 | 0.1 | 39.2 | |
| 8 | 2차 건조 | 3:00:00 | 40 | 0.1 | 42.2 | 0.31 |
| 9 | 2차 건조 | 2:30:00 | 40 | 0.1 | 44.7 | |
| 10 | 통기 | 00:30:00 | 40 | 800 | 45.2 | |
| 11 | 마개로 막음 | 0:01:00 | 40 | 800 | 45.2 | |
| 12 | 저장 | 0:30:00 | 5 | 1000 | 45.7 | |

[0595] **[0472]** 최적화된 동결건조 공정으로부터 수득된 동결건조 제형을 본원에 기재된 분석 방법에 의해 평가하였다.

[0596] **[0473]** 동결 건조된 케이크는 건조 후 광학적으로 평가하였다. 고려한 파라미터는 케이크의 조밀함, 바이알 벽과의 접촉, 케이크의 형태, 색상 및 전체 외관을 포함하였다. 동결건조된 샘플의 분석은 조밀한 구조와 갈색을 띤 착색으로 양호한 외관을 나타냈다.

[0597] **[0474]** 동결건조된 케이크의 수분 함량은 전기량 칼 피셔 적정기 Aqua 40.00(Analytik Jena GmbH)을 사용하여

결정되었다. 모든 샘플의 낮은 잔류 수분 함량이 관찰되었다.

[0598] **[0475]** Mettler Toledo DSC1_943(Mettler Toledo, Germany)에서 시차 주사 열량계(DSC)를 수행하여 동결 건조된 생성물의 유리 전이 온도(Tg), 결정화 및 흡열 용융을 측정하였다. 전반적으로 결과 범위는 111℃에서 117℃ 사이로 안정적인 생성물 케이크를 나타낸다. 육안 검사, 탁도, UV 분광법, HP-SEC 및 RP-HPLC에 의한 분석 전에 동결건조된 바이알을 재구성하였다. 물을 사용하여 바이알을 재구성하였다. 관찰된 재구성 시간은 ~1분에서 ~1.5분 범위로 짧고 상응하였다. 재구성 시, 동결건조된 생성물은 중간 내지 강한 발포를 나타냈다.

[0599] **[0476]** 가시적 검사는 2,000 내지 3,750lux에서 유럽 약전(9판, 모노그래프 2.9.20)에 따라 흰색 배경 앞에서 5초 동안 및 검정색 배경 앞에서 5초 동안 부드러운 수동 방사형 교반 하에 바이알을 가시 입자의 존재 또는 부재에 대해 수행하였다. 검사는 훈련된 두 명의 검사자가 독립적으로 수행하였다. 어떠한 가시적 입자가 공정 조건에 상관 없이 임의의 분석된 샘플에서 검출되지 않았다. 모든 용액은 착색되고 점성이 있는 것으로 나타났다. 또한 재구성 후 일부 경우에 기포가 검출되지 않았다.

[0600] **[0477]** 860 nm에서 작동하고 90° 각도에서 검출하는 NEPHLA 탁도계(Dr. Lange, Dusseldorf, Germany)를 탁도 측정에 사용하였다. 매우 낮은 탁도는 연구 전반에 걸쳐 모든 샘플에 대해 수득하였다. 최적화 사이클의 다양한 공정 파라미터의 변형은 제형의 탁도에는 영향을 미치지 않았다.

[0601] **[0478]** UV 분광법은 C Technologies SoloVPE 기기를 사용하여 수행하였다. 모든 단백질 농도는 20-30 mg/ml의 사양 범위내에 있다. 대부분의 측정을 위해 T-액체L와 비교하여 동결건조 및 재구성(T-Lyo) 후에 더 높은 단백질 농도를 향한 약간의 경향이 관찰되었다. 3개 주기 모두의 T-Lyo 샘플의 경우 더 높은 흡광도는 예를 들어 육안 검사에서도 관찰된 기포로 인한 광산란으로 인한 것일 수 있다.

[0602] **[0479]** 93%에서 95% 사이의 높은 PEG-CBS 함량을 갖는 유사한 HP-SEC 프로필이 연구 전반에 걸쳐 결정되었다. 어떠한 탈-페길화된 CBS는 임의의 샘플에서 검출되지 않았다. 따라서 변경된 동결건조 공정 파라미터는 샘플의 페길화에 영향을 미치지 않았으며 HP-SEC에서 검출될 수 있는 새로운 종의 생성으로 이어지지 않았다. HP-SEC 프로필과 일치되게 변형된 동결건조 공정 조건도 페길화 프로필에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다.

[0603] **[0480]** 단백질 농도는 A280nm GPBT1198을 사용하여 결정하였다. 유리된-PEG 함량은 RP-HPLC GPBT3078을 통해 결정하였다. 동결건조 전 및 후에, 중앙 및 엣지 바이알 샘플 간의 샘플의 단백질 농도에서 어떠한 명확한 변화가 관찰되지 않았다. 동결건조 전후의 샘플을 비교하면 유리된 PEG 함량 및 활성의 실질적인 변화가 결정되지 않았다. 따라서 최적화된 동결건조 사이클 파라미터는 분석된 생성물 품질 속성에 음성적 영향을 미치지 않았다.

[0604] **[0481]** 요약하면, 동결건조 과정은 동결, PD 및 SD 파라미터를 조정함에 의해 성공적으로 최적화되었다. 최적화된 공정은 ≤48시간의 상당히 감소된 실행 시간을 특징으로 한다. 적용된 고체 또는 액체 상태 분석 방법 중 어느 것도 생성물 품질에 대한 공정 최적화의 손상을 지적하였다. 더욱이, 사이클 3 내에서 가장자리 및 중앙 바이알 위치의 비교는 생성물이 PD 동안 배치 생성물 온도 불균일성에 대해 강건함을 보여주었다.

[0605] **실시예 18. 다운스트림 정제 공정 파라미터의 평가**

[0606] **[0482]** 효소 시스타티오닌-β-신타제(CBS) 정제를 위한 대안적 다운스트림 공정은 기존 공정의 수율 개선 및 회수를 목표로 대규모로 수행하였다. 바이오매스는 10L 규모의 최소 배지에서 유가식 발효(고세포 밀도 발효)에 의해 생산되었다. 수확 시, 바이오매스는 원심분리를 통해 배지로부터 분리하고 용해 완충액에 재현탁시키고 고압 균질화를 통해 파괴시켰다. 원심분리를 통해 세포 잔해로부터 세포 추출물을 분리한 후, 상청액을 함유하는 CBS를 심층 여과 시퀀스에 의해 정화한 다음 (i) HiTrap DEAE 세파로스 FF( GE), (ii) 킬레이트 세파로스 FF(GE)를 사용한 고정화 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC)(Zn2+ 하전 매질 포함) 중간 단계 및 (iii) 부틸-S 세파로스 6 FF(GE)를 사용한 연마 단계로서 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 포함하는 후속 크로마토그래피 트레인을 위한 출발 물질로서 사용되었다. 정제된 CBS의 접선유동여과(TFF)에 의한 정용여과 후, 페길화를 수행하였다. 제형화를 위해, 페길화된 CBS를 정용여과하고 TFF에 의해 다시 농축시켰다. 세포 용해물의 PEI 침전(0.35%), 인산염에서 HEPES로의 완충 시스템 변화 및 Tween™20으로의 Triton X-100 대체가 대안적 공정에 사용되었다.

[0607] **A. 발효**

[0608] **[0483]** 정제 공정 최적화 및 스케일-업에 필요한 바이오매스 생성을 위해 최소 배지에서 2회의 일관된 10L 유가식 발효를 수행하였다. 모든 스케일-업 수행을 위해, 발효기 2 (수거 용적 9.2L; 바이오매스: 1791g)에서 생성

된 바이오매스를 사용하였다.

[0609] **B. 다운스트림 정제 공정의 스케일-업**

[0610] **[0484]** 정제 공정 1은 하기의 단계 중 하나 이상을 포함하였다: (i) 세포 수거, (ii) 세포 재현탁, (iii) 세포 파쇄, (iv) 폴리에틸렌이민 (PEI) 침전, (v) 원심분리, (vi) 멸균 여과, (vii) 포스페이트로부터 HEPES로의 재완충을 위한 제3 세척 단계와 함께 DEAE 세파로스 FF를 사용하여 포획, (viii) 아연 이온으로 하전된 킬레이팅 세파로스 FF를 사용한 중간 단계, (ix) 부틸-s-세파로스 6 FF를 사용한 연마 단계, (x) TFF 및 (xi) 페길화.

[0611] **[0485]** 정제 공정 2는 하기의 단계 중 하나 이상을 포함하였다: (i) 세포 수거, (ii) 세포 재현탁, (iii) 세포 파쇄, (iv) 원심분리, (v) 심층 여과, (vi) 멸균 여과, (vii) DEAE 세파로스 Ff를 사용한 포획, (viii) 아연 이온으로 하전된 킬레이팅 세파로스 FF를 사용한 중간 단계, (ix) HEPES로부터 포스페이트로의 재완충을 위해 포함된 제2 세척 단계와 함께 부틸-s-세파로스 6 FF를 사용한 연마 단계 및 CBS의 침전을 회피하기 위해 포함된 희석 단계, (x) TFF 및 (xi) 페길화.

[0612] **C. 포획 단계**

[0613] **[0486]** 고압 균질화를 통해 세포 파쇄 후, PEI 침전에 이어서 멸균 여과를 수행하였다. 포획 단계의 총 CBS 회수는 58.1% (5.4 g CBS; 2.5 g/L CBS)이었다. 포획 용출 풀의 총 단백질 함량은 7.5 g이었다. 정제 공정 2a의 CBS 회수 및 수율을 확인(85.1% 회수; 5.4 g CBS; 2.6 g/L CBS)하였고, 정제 공정 1 (47.7% 회수; 5.3 g CBS; 1.03 g/L CBS)에서 보다 높았다. 전반적으로 PEI 침전과 컬럼 상의 재완충은 수율에 명백한 음성적 영향을 미치지 않았다.

[0614] **D. 중간 단계**

[0615] **[0487]** 포획 용출 풀은 4℃ 내지 8℃에서 밤새 저장하고, 아연 이온으로 하전된 킬레이팅 세파로스 FF를 사용한 중간 단계에서 공정 2일째에 추가로 가공하였다.

[0616] **E. 연마 단계**

[0617] **[0488]** 중간 용출 풀은 20 mM HEPES 완충액으로 희석하여 약 1.6g/L의 CBS 농도를 수득하였다. 이어서, 4℃ 내지 8℃에서 밤새 저장하기 위해 10mM EDTA를 첨가하였다. 공정 3일째, 황산암모늄(1.4 M 최종 농도)을 연마 컬럼을 부하하기 전에 첨가하였다.

[0618] **[0489]** 통류(flow-through)에서, 측정된 흡광도 신호가 없었고, 즉, 세척할 어떠한 단백질 및 어떠한 CBS가 없었다. 정제 공정에서 용출 프로필을 결정하였다.

[0619] **[0490]** 정제 공정은 92.9% 이상의 CBS 회수를 산출하였다. 중간 용출 풀의 사전 희석으로 인해 농축 효과가 없었고 연마 컬럼에 CBS 침전이 관찰되었으며, 약 8%의 회수율 증가를 유도하였다. 전체 CBS 회수율은 시험된 모든 정제 공정에 대해 38.7% 이상이었다. 용출 풀을 페길화 완충액에 대해 정용여과하고 TFF(Vivaflow 200, 50kDa, PES)를 통해 40g/L CBS로 농축했다. TFF-보유물을 사용하여 CBS 품질을 결정하기 위해 포괄적인 분석을 수행하였다.

[0620] **F. 페길화**

[0621] **[0491]** 소량(1mL)의 TFF-보유물을 소규모로 페길화하고, SDS-PAGE, HPLC(SE-, RP- 및 AEX-) 및 IEF로 분석하고, PEG-CBS 참조 표준과 비교하였다. 페길화 동력학을 SE-HPLC(4~5시간 후 1회 측정)로 모니터링하고 상대 체류 = tR(PEG-CBS)/tR(CBS) × 100%(tR은 각각의 종의 체류 시간임)를 결정하였다. 상대 체류(정수로서 나타내는)가 85% 초과인 경우, 이것은 추가 PEG가 첨가될 필요가 있을 수 있음을 지적하였다. 4.3시간 후 상대 체류 시간은 82.4%이고, 즉, 이것은 임계값 85% 미만이었다. 따라서, 어떠한 추가의 PEG를 첨가하지 않았다. 24시간 페길화 후, 상대적 체류 시간은 82.8%였다.

[0622] 등가물 및 범위

[0623] **[0492]** 통상의 기술자는 본원에 기재된 개시내용에 따른 특정 구현예에 대한 다수의 등가물을 통상적인 실험을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있다. 본원 개시내용의 범위는 상기 상세한 설명에 한정되는 것으로 의도되지 않고 첨부된 특허청구범위에서 제시된 바와 같다.

[0624] **[0493]** 특허청구범위에서, 단수 및 "상기"와 같은 표현은 달리 반대로 명시되거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면 하나 이상을 의미한다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는" 을 포함하는 특허청구범위 또는 상세

한 설명은 그룹 구성원의 1개, 1개 이상 또는 모두가 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않거나 달리 이와 반대로 명시되지 않거나 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면, 만족스로운 것으로 간주된다. 본원의 개시내용은 그룹의 정확히 하나의 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다. 본원의 개시내용은 그룹의 정확히 하나 이상 또는 전체 구성원이 존재하거나 사용되거나 달리 주어진 물건 또는 방법과 관련되지 않는 실시형태를 포함한다.

[0625] **[0494]** 용어 "포함하는" 은 개방적인 것으로 의도되며, 추가의 요소 또는 단계를 허용하지만 요구하지 않는다. 용어 “포함하는”이 본원에 사용된 경우, 따라서 용어 “로 이루어진”은 또한 포괄되고 기재된다.

[0626] **[0495]** 범위가 주어지는 경우, 평가변수는 포함된다. 더욱이, 달리 명시되지 않거나 달리 문맥 및 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않다면, 범위로서 표현된 수치는 본원 개시내용의 다양한 구현예에서 명시된 범위 내의 임의의 특정 수치 또는 하위 범위를 달리 문맥에 의해 명백히 지시되지 않는다면 범위의 하한의 단위의 10배까지 상정한다.

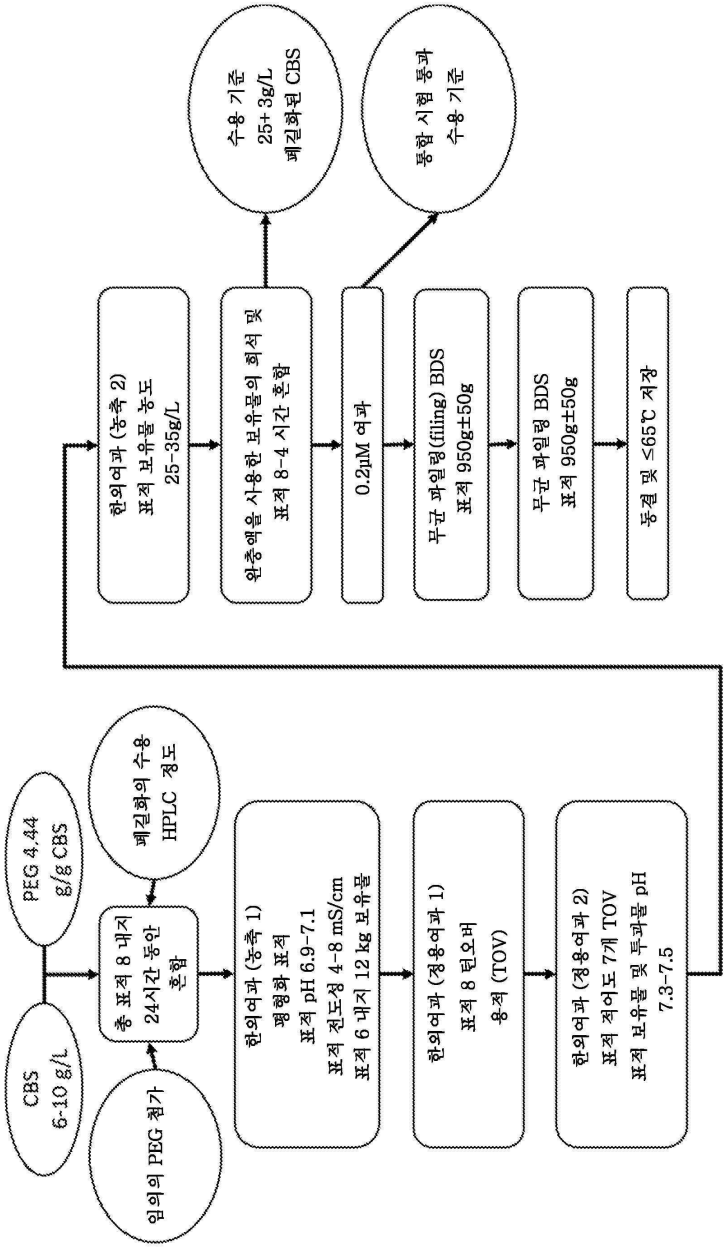
[0627] **[0496]** 또한, 종래 기술 내에 속하는 본원 개시내용의 임의의 특정 실시형태는 임의의 하나 이상의 특허청구범위로부터 명시적으로 배제될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 실시형태는 통상의 기술자에게 알려져 있는 것으로 간주되기 때문에, 배제가 본원에서 명시적으로 설명되지 않을 지라도, 이들은 배제될 수 있다. 본원 개시내용의 조성물의 임의의 특정 구현예 (예를 들어, 임의의 항생제, 치료제 또는 활성 성분; 임의의 제조 방법; 임의의 사용 방법 등)는, 종래 기술의 존재에 관련되든지 않든지간에, 임의의 하나 이상의 특허청구범위로부터 배제될 수 있다.

[0628] **[0497]** 사용된 단어는 제한이 아니라 설명의 단어이며, 더 넓은 양상에서 본 개시의 진정한 범위 및 정신을 벗어나지 않고 첨부된 청구범위의 범위 내에서 변화가 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

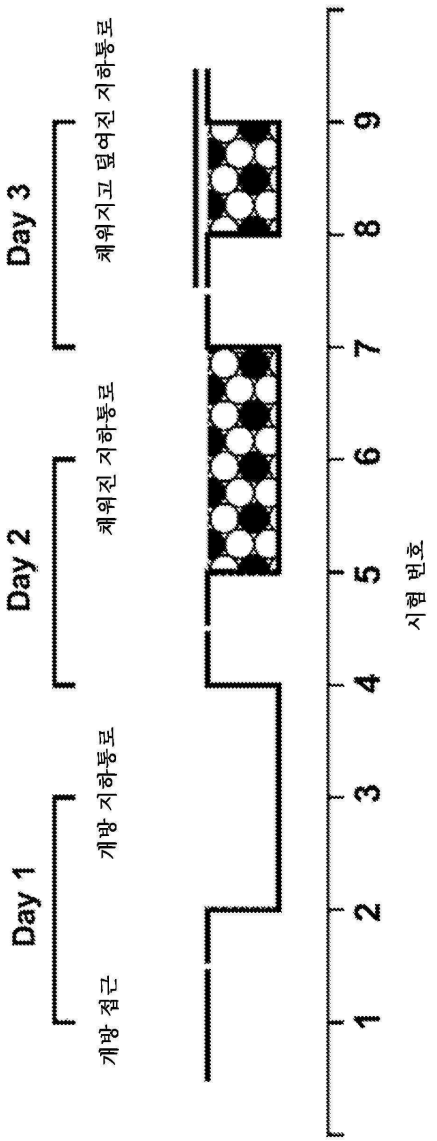
[0629] **[0498]** 본원 개시내용이 몇 가지 기재된 구현예에 대해 어느 정도 상세하게 기재되었지만, 그것이 임의의 그러한 세부사항 또는 실시예 또는 임의의 특정 실시예로 제한되어야 하는 것으로 의도되지 않고 참조로 해석되어야 하고, 선행 기술의 관점에서 그러한 청구 범위의 가능한 가장 넓은 해석을 제공하고 따라서 개시 내용의 의도된 범위를 효과적으로 포괄하기 위해 첨부된 청구범위에 대해 설명된다.

## 도면

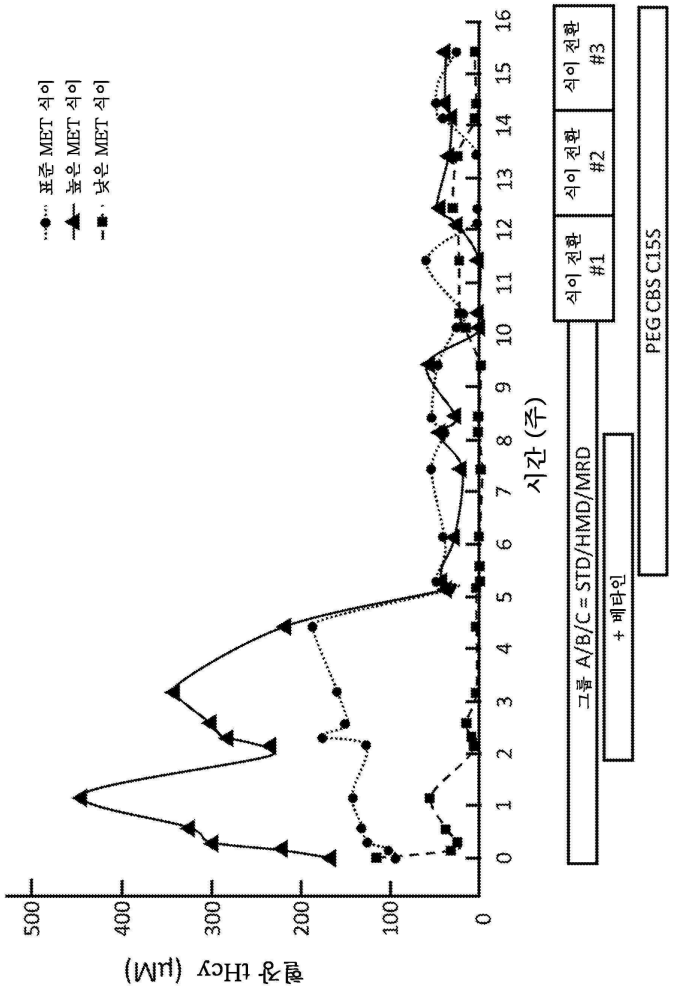
### 도면1


CBS
6-10 g/L
PEG 4.44
g/g CBS
임의의 PEG 첨가
총 표적 8 내지
24시간 동안
혼합
폐길화의 수용
HPLC 정도
한외여과 (농축 1)
평형화 표적
표적 pH 6.9-7.1
표적 전도성 4-8 mS/cm
표적 6 내지 12 kg 보유물
한외여과 (정용여과 1)
표적 8 린오버
용적 (TOV)
한외여과 (정용여과 2)
표적 적어도 7개 TOV
표적 보유물 및 투과물 pH
7.3-7.5
한외여과 (농축 2)
표적 보유물 농도
25-35g/L
완충액을 사용한 보유물의 희석 및
표적 8-4 시간 혼합
0.2μM 여과
무균 파일링(filing) BDS
표적 950g±50g
무균 파일링 BDS
표적 950g±50g
동결 및 ≤65℃ 저장
수용 기준
25+ 3g/L
폐길화된 CBS
통합 시험 통과
수용 기준

도면2


Day 1
개방 접근
개방 지하통로
Day 2
채워진 지하통로
Day 3
채워지고 덮여진 지하통로
1
2
3
4
5
6
7
8
9
시험 번호

## 도면3




## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ORPHAN TECHNOLOGIES, LTD.

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY CORPORATE

JAN P. KRAUS

RANDY WANNER

DOROTHEA HOHMANN

<120> DRUG PRODUCT FOR ENZYME THERAPY FOR TREATMENT OF HOMOCYSTINURIA

<130> 2089.1005PCT

<140> PCT/USXXXX/XXXXXX

<141> 2020-06-26

<150> 62/983,860

<151> 2020-03-02

<150> 62/866,810

<151> 2019-06-26

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 412

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Ser Pro His
1               5                  10                  15
Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser Pro
            20                  25                  30
Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala Pro
        35                  40                  45
Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro His
    50                  55                  60

His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile Leu
65                  70                  75                  80
Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly Lys
                85                  90                  95
Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe Asn
            100                 105                 110
Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu Asp
        115                 120                 125

Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu Pro
    130                 135                 140
Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val Arg
145                 150                 155                 160
Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu Lys
                165                 170                 175
Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro Thr
```

180 185 190

Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp Arg
195 200 205
Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg Asn
210 215 220
Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile Leu
225 230 235 240
Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly Thr
245 250 255

Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys Pro
260 265 270
Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala Glu
275 280 285
Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu Gly
290 295 300
Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val Asp
305 310 315 320

Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg Met
325 330 335
Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser Thr
340 345 350
Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln Arg
355 360 365
Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys Phe
370 375 380

Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu Asp
385 390 395 400
Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg
405 410

<210> 2

<211> 551

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
1 5 10 15

His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30

Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
35 40 45

Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
50 55 60

His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65 70 75 80

Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly
85 90 95

Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe
100 105 110

Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu
115 120 125

Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu
130 135 140

Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val
145 150 155 160

Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu
165 170 175

Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro
180 185 190

Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp
195 200 205

Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg
210 215 220

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

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

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

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

465 470 475 480

Lys Val Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Gln Ile Arg Leu Thr Asp Thr Leu
485 490 495
Gly Arg Leu Ser His Ile Leu Glu Met Asp His Phe Ala Leu Val Val
500 505 510
His Glu Gln Ile Gln Tyr His Ser Thr Gly Lys Ser Ser Gln Arg Gln
515 520 525
Met Val Phe Gly Val Val Thr Ala Ile Asp Leu Leu Asn Phe Val Ala
530 535 540

Ala Gln Glu Arg Asp Gln Lys
545 550

<210> 3

<211> 1656

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gttgcccgca ccgtagcggt 60

ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa 120

ccgctgtgga ttcgtccgga cgcaccgtca cgctgtacct ggcagctggg tcgtccggca 180

agcgaatctc cgcatcacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatatc 240

ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatggtt cgtatcaaca aaatcggcaa aaaattcggt 300

ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcggttc cgtgaaagat 360

cgtatctcac tgcgcatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcaccctgaa accgggtgat 420

acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggcggcagtc 480

cgtggttatc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc 540

ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttcgt accccgacga atgcccgctt cgacagtccg 600

gaatcccatg tgggtgttgc atggcgcctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg 660

gatcagtatc gtaacgctag caatccgctg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc 720

ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggtcgctt ctgtgggtac cggcggtacc 780

attacgggca tcgcgcgtaa actgaaagaa aaatgcccgg gctgtcgcat tatcggtgtg 840

gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg 900

tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tcctggatcg cacggtggtt 960

gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct 1020

caggaaggtc tgctgtgcgg tggttcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaaagct 1080

gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtcgtgattc tgccggattc tgttcgcaac 1140

tacatgacca aatttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggcttcct gaaagaagaa 1200

gatctgaccg agaaaaaacc gtggtggtgg cacctgcgcg tgcaggaact gggtctgtcc 1260

gcaccgctga ccgttctgcc gaccatcacg tgcggccata cgattgaaat cctgcgtgaa 1320

aaaggttttg atcaggcccc ggttgtcgac gaagcaggcg tgattctggg tatggttacc 1380

ctgggtaaca tgctgagttc cctgctggcg ggcaaagtgc aaccgagcga tcaggttggt 1440

aaagtcatct acaaacaatt caaacagatt cgtctgaccg atacgctggg ccgcctgtcg 1500

cacatcctgg aaatggacca tttcgcgctg gttgtgcacg aacagattca ataccatagc 1560

accggcaaat catcgcagcg ccaaatggtc tttggtgtcg tgacggccat tgatctgctg 1620

aatttcgtgg ccgcacaaga acgtgaccag aaataa 1656

<210> 4

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 4

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
1 5 10 15

His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30

Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
35 40 45

Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
50 55 60

His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65 70 75 80

Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly
85 90 95

Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe

100 105 110

Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu

115 120 125

Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu

130 135 140

Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val

145 150 155 160

Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu

165 170 175

Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro

180 185 190

Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp

195 200 205

Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg

210 215 220

Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile

225 230 235 240

Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly

245 250 255

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys

260 265 270

Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala

275 280 285

Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu

290 295 300

Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val

305 310 315 320

Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg

325 330 335

Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser

340 345 350

Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln

355 360 365

Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys

370 375 380

Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu

385 390 395 400

Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg

405 410

<210> 5

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic

Truncated human C15S mutant CBS polypeptide

<400> 5

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Ser Pro

1 5 10 15

His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser

20 25 30

Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala

35 40 45

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

50 55 60

His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile

65 70 75 80

Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly

85 90 95

Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe

100 105 110

Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu

115 120 125

Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu

130 135 140

Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val

145 150 155 160

Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu

165 170 175

Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro

180 185 190

Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp

195 200 205

Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg

210 215 220

Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile

225 230 235 240

Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly

245 250 255

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys

260 265 270

Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala

275 280 285

Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu

290 295 300

Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val

305 310 315 320

Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg

325 330 335

Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser

340 345 350

Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln

355 360 365

Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys

370 375 380

Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu

385 390 395 400

Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg

405 410