

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0053468
(43) 공개일자 2020년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7003304

(22) 출원일자(국제) 2018년07월05일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년02월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/040957

(87) 국제공개번호 WO 2019/010335

국제공개일자 2019년01월10일

(30) 우선권주장

62/529,385 2017년07월06일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아

미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨빅 센터 볼러바드 3600

(72) 발명자

한더러 크리스티안

미국 루이지애나 70115 뉴올리언스 로렐 스트리트 4723

윌슨 제임스 엠.

미국 펜실베니아 19103 필라델피아 텔란시 스트리트 1831

(74) 대리인

특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 38 항

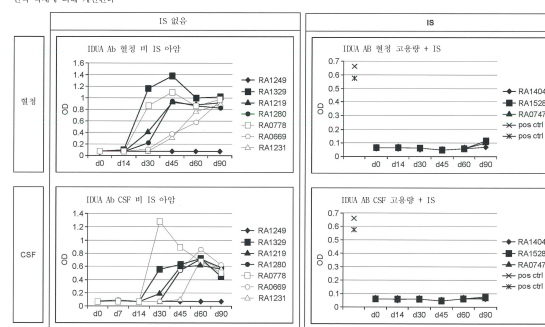
(54) 발명의 명칭 I형 점액다당류증을 치료하기 위한 유전자 요법

(57) 요약

hIDUA 유전자 및 2종 이상의 면역 억제제를 함유하는 발현 카세트의 AAV9-매개 척추강내/낭내 및/또는 전신 전달을 포함하는 공동 치료 요법이 본 명세서에 제공된다. 또한 hIDUA 결핍증(MPSI) 및 혈리, 혈리-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 치료하는 데 유용한 방법이 제공된다.

대표도

AAV9 hIDUA: MPSI 임질성 연구, IDUA에 대한 제형된 면역 반응은 면역 억제에 의해 개선된다



- 1:10,000 희석배수로 검사된 혈청
- 1:20 희석배수로 테스트된 CSF
- 면역 억제 요법: MMF (마이티스 21일 내지 40일, CSF d61에서 RA1001 MMF 중단 제외)

(52) CPC특허분류

A61K 38/47 (2013.01)

A61P 43/00 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/616,106 2018년01월11일 미국(US)

62/530,614 2017년07월10일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 환자에서 알파-L-이두로니다제 결핍증의 치료에 유용한 치료 요법으로서, 요법은

(a) AAV9 캡시드 및 환자에서 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 가진 재조합 AAV(rAAV)로서, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 이것은 기능성 hIDUA를 암호화하는 재조합 AAV;

(b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제; 및

(c) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제

를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며,

적어도 하나의 면역 억제제의 투여는 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고;

면역 억제제 중 적어도 하나의 투여는 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속되는, 요법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 환자는 처음에 정맥내로 스테로이드에 이어서 경구로 스테로이드가 투약되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 면역 억제제는 하나 이상의 코르티코스테로이드 및 선택적으로, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF), 및/또는 하나 이상의 마이크로라이드인 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 4

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 마이크로라이드는 템시롤리무스 또는 시롤리무스를 포함하는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 5

제2 항 내지 제4 항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 스테로이드의 투약은 벡터 투약 후 12주에 중단되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 6

제1 항 내지 제5 항 중 어느 한 항에 있어서, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스는 벡터 주여 전 0 내지 15일 동안 전달되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 7

제1 항 내지 제5 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제는 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 시롤리무스인 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 8

제1 항 내지 제6 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제가 타크롤리무스 및 시롤리무스를 모두 포함할 때, 약 4 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 또는 총 약 8 ng/mL 내지 약 16 ng/mL의 혈액 트로프 수준을 유지하기 위해 각각의 낮은 용량이 사용되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 9

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제가 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나만을 포함할 때, 총 용량은 약 16 ng/mL 내지 약 24 ng/mL의 범위인 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 10

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나만이 사용되고, 초기 장입 용량은 약 3 mg/m^2 인 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 11

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제 요법은 백터 투여 전 대략 -제14 일 내지 -제1 일에 시작되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 암호화된 hIDUA는

- (a) 서열 번호 2의 약 아미노산 1 내지 약 653(젠뱅크 NP_000193); 및
- (b) 서열 번호 2의 약 아미노산 27 내지 약 653에 융합된 이중성 리더 서열을 포함하는 합성 인간 효소로부터 선택되는 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 13

제1 항 내지 제12 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열은 5' 반전 말단 반복부(ITR) 서열, 닭 베타 액틴 인트론, CB7 프로모터, 폴리 A 신호, 및/또는 3' ITR 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 14

제1 항 내지 제13 항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 pH 6 내지 9를 가진 현탁액 중에 있는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 15

제14 항에 있어서, rAAV는 척추강내 주사를 통해 전달되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 16

제15 항에 있어서, hIDUA 유전자를 포함하는 rAAV를 정맥내로 공동 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 요법

청구항 17

제1 항 내지 제16 항 중 어느 한 항에 있어서, 요법의 효능은 선택적으로 청각 뇌간 검사에 의해 청각 능력 변화를 측정함으로써 평가되는 것을 특징으로 하는 요법.

청구항 18

제1 항 내지 제17 항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는

- (i) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} 개의 GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} 개의 GC;
- (ii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} 개의 GC; 또는
- (iii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} 개의 GC 또는 약 1.1×10^{13}

내지 약 5.5×10^{13} 개의 GC

의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 인간 대상체로의 척추강내 주사를 위해 제형화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 제조합 AAV 벡터를 포함하는 조성물로서, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 이것은 기능성 hIDUA를 암호화하고, AAV 벡터는

(a) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} 개의 GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} 개의 GC; 또는

(b) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} 개의 GC 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} 개의 GC; 또는

(c) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} 개의 GC 또는 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} 개의 GC

의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 필요로 하는 인간 대상체로의 척추강내 주사를 위해 제형화되는, 조성물.

청구항 20

제19 항에 있어서,

(i) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제; 및

(ii) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제

와 공동 요법으로 사용을 위한 것이며,

면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고;

면역 억제제 중 적어도 하나의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 21

인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 제조합 AAV 벡터와 조합 요법으로 사용을 위한 면역 억제제로서, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 이는 기능성 hIDUA를 암호화하고,

면역 억제제는 (a) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 항-대사물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제; 및 (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제를 포함하고,

면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고; 면역 억제제 중 적어도 1종의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속되는, 면역 억제제.

청구항 22

제21 항에 있어서, AAV 벡터는

(i) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} 개의 GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} 개의 GC;

(ii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} 개의 GC 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} 개의 GC; 또는

(iii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} 개의 GC 또는 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} 개의 GC

의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 필요로 하는 인간 대상체로의 척추강내 주사를 위해 제형화되는 것을 특징으로 하는 면역 억제제.

청구항 23

제19 항 또는 제20 항에 있어서, 또는 제21 항 또는 제22 항에 있어서, 면역 억제제는 백터 전달 전에 환자에게 투여 가능한 정맥내 스테로이드 및 백터 전달 후에 환자에게 투여 가능한 경구용 스테로이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 24

제20 항에 있어서, 또는 제21 항 또는 제22 항에 있어서, 면역 억제제는 하나 이상의 코르티코스테로이드 및 선택적으로, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 하나 이상의 마이크로라이드인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 25

제24 항에 있어서, 하나 이상의 마이크로라이드는 템시롤리무스 또는 시롤리무스를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 26

제23 항 내지 제25 항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 스테로이드를 투약하는 것은 백터 투약 후 12주에 중단되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 27

제23 항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 있어서, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스는 백터 투여 전에 0 내지 15일 동안 전달되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 28

제23 항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제는 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 시롤리무스인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 29

제23 항 내지 제26 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제가 타크롤리무스 및 시롤리무스를 모두 포함할 때, 약 4 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 또는 총 약 8 ng/mL 내지 약 16 ng/mL의 혈액 트로프 수준을 유지하기 위해 각각의 낮은 용량이 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 30

제20 항 내지 제28 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제제가 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나만을 포함할 때, 총 용량은 약 16 ng/mL 내지 약 24 ng/mL의 범위인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 31

제30 항에 있어서, 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나가 사용되고, 초기 장입 용량은 약 3 mg/m^2 인 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 32

제20 항 내지 제30 항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 억제 요법은 벡터 투여 전 약 -제14 일 내지 -제1 일에 시작되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 33

제19 항, 제20 항, 또는 제23 항 내지 제31 항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제20 항 내지 제31 항 중 어느 한 항에 있어서, 암호화된 hIDUA는

- (a) 서열 번호 2의 약 아미노산 1 내지 약 653(젠뱅크 NP_000193); 및
- (b) 서열 번호 2의 약 아미노산 27 내지 약 653에 융합된 이중성 리더 서열을 포함하는 합성 인간 효소로부터 선택되는 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 34

제19 항, 제20 항, 또는 제23 항 내지 제31 항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제21 항 내지 제32 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열은 5' 반전 말단 반복부(ITR) 서열, 닭 베타 액틴 인트론, CB7 프로모터, 폴리 A 신호, 및/또는 3' ITR 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 35

제19 항, 제20 항, 또는 제23 항 내지 제31 항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제21 항 내지 제32 항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV는 pH 6 내지 9를 가진 현탁액 중에 있는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 36

제35 항에 있어서, rAAV는 척추강내 주사를 통해 전달되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 37

제19 항, 제20 항, 또는 제23 항 내지 제36 항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제21 항 내지 제36 항 중 어느 한 항에 있어서, hIDUA 유전자를 포함하는 rAAV를 정맥내로 공동 투여하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

청구항 38

제19 항, 제20 항, 또는 제23 항 내지 제36 항 중 어느 한 항에 있어서, 또는 제21 항 내지 제36 항 중 어느 한 항에 있어서, 요법의 효능은 선택적으로 청각 뇌간 검사에 의해 청각 능력 변화를 측정함으로써 평가되는 것을 특징으로 하는 조성물 또는 면역 억제제.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 연방정부 지원 연구의 언급
- [0002] 본 출원은 미국 정부, 미국 국립 보건원(NIH) 번호, R01DK54481, P400D010939 및 P30ES013508로부터의 승인에 의해 부분적으로 지원된 작업을 포함한다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 가질 수 있다.
- [0003] 도입
- [0004] 본 발명은 혈리, 혈리-샤이에(혈리-샤이에) 및/또는 샤이에 증후군으로 진단된 환자를 포함하는 I형 점액다당류증(MPS I)을 치료하기 위한 유전자 요법 접근에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 점액 다당류증은 뮤코 다당류로도 불리는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan: GAG)의 분해에 수반된 특정 라이소좀 효소의 결핍증에 의해 야기되는 유전성 장애의 그룹이다. 부분적으로-분해된 GAG의 축적은 세포, 조직, 및 기관 기능의 방해를 야기한다. 시간에 따라, GAG는 세포, 혈액 및 결합조직 내에 축적되어, 세포 및

기관 손상의 증가를 초래한다. 점액 다당류증(MPS) 장애 중 가장 심각한 것 중 하나인 MPS I는 효소 α-L-이두로니다제(IDUA)의 결핍증에 의해 야기된다. 구체적으로는, 알파-L-이두로니다제는 헤파란 황산 및 더마탄 황산으로 불리는 2종의 GAG로부터 말단 이두론산 잔기를 제거하는 것으로 보고된다. 알파-L-이두로니다제는 상이한 유형의 분자를 분해하고 재이용하는 세포 내의 구획인 라이소좀에 위치된다. IDUA 유전자는 글리코사미노글리칸(GAG)으로 불리는 거대 당 분자의 파괴에 필수적인 알파-L-이두로니다제 효소를 생성하기 위한 지시를 제공하는 것으로 보고되었다. IDUA 유전자에서 100개 초과 돌연변이는 I형 점액다당류증(MPS I)을 야기하는 것이 발견되었다. 하나의 DNA 빌딩 블록(뉴클레오타이드) - 단일 뉴클레오타이드 다형성 또는 "SNP"를 변화시키는 돌연변이가 가장 통상적이다.

[0006] MPS I을 야기하는 돌연변이는 알파-L-이두로니다제의 기능을 감소시키거나 또는 완전히 제거하여 3가지의 임상 증후군을 야기한다: 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에 증후군. 각각은 효소 결핍증이 임상 표현형의 중증도와 직접 관련되는 정도로 상염색체 열성 방식으로 유전된다. 혈러 증후군은 IDUA 결핍증의 가장 중증의 징후를 나타내며, 보통 2개의 삭제 돌연변이에 기인하여 효소 활성의 총 부재 상황에서 일어난다. 임상 진단은 2세 전에 확립되며, 다중 신체 병리와 관련된다. 추가로, 자연사 데이터는 혈러 증후군 유전자형을 갖는 환자가 증후군의 인지 결함 및 정신지체를 야기하는 CNS 관여를 가진다는 것을 단호히 확인하였다. 혈러-샤이에 증후군은 보통 2 내지 8세에 진단된 더 약화된 형태이다. 혈러 증후군과 대조적으로, 혈러-샤이에 환자는 임상 징후의 후기 개시 및 질환의 더 약화된 진행을 야기하는 (이론적) 소량의 잔여 IDUA 활성을 가진다. 더 약화된 표현형에도 불구하고, 일부 혈러-샤이에 환자는 IQ의 저하로 증명된 바와 같은 신경인지 쇠퇴를 포함하는, IDUA 결핍증과 관련된 CNS 병리의 다중 증상을 경험한다. 샤이에 증후군은 MPS I의 가장 경증의 형태이다. 증상은 일반적으로 5세 후에 나타나기 시작하며, 진단은 10세 이후에 가장 통상적으로 이루어진다. 샤이에 증후군을 갖는 어린이는 정상 지능을 갖거나 또는 경증의 학습 장애를 가질 수 있고; 일부는 정신 의학 문제를 가질 수 있다. 녹내장, 망막 변성 및 흐릿한 각막은 시력을 상당히 손상시킬 수 있다. 다른 문제는 수근관 증후군 또는 다른 신경 압박, 뻣뻣한 관절, 갈퀴손 및 변형된 발, 짧은 목 및 대동맥관 질환을 포함한다. 일부 병에 걸린 개체는 또한 폐쇄성 기도 질환 및 수면 무호흡을 가진다. 샤이에 증후군을 갖는 사람은 성인기까지 살 수 있다.

[0007] 임상 증후군에 대해, 혈러 증후군에 대한 치료의 현재 표준은 조혈모세포 세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation: HSCT), 예컨대 골수 이식(bone marrow transplantation: BMT) 또는 제대혈 이식(umbilical cord blood transplantation: UCBT)이다. 절차는 가능한 빨리, 그리고 2세 전에 행해져서, 질환의 신체와 CNS 양상 둘 다에 영향을 미친다. 그러나, MPS I에 대한 HSCT는 상당한 양의 이환율 및 20% 사망률과 관련된 채로 남아있다. 이식이 선택사항이 아니라면, 환자 수명을 위해 매주 효소 주입을 필요로 하는 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy: ERT)이 시작될 수 있다. ERT는 CNS 질환의 진행에 영향을 미치지 않지만, 신체 징후를 부분적으로 개선시킨다. 골격계, 눈 및 심장에서의 질환 양상은 단지 부분적으로 개선되지만 장기종대(Organomegaly)는 상당히 개선된다. 환자는 둔부 및 무릎을 안정화시키기 위해 그리고 수근관 증후군 및 손가락 수축을 치료하기 위해 수술이 필요할 수 있다. 심장질환은 수술이 종국적으로 필요할 수 있지만 의학적으로 치료된다.

[0008] MPS I에 대한 ERT는 라이소좀 내로 흡수 및 GAG의 증가된 이화작용을 위해 외인성 효소를 제공한다. 라이소좀 효소는 내부로 작용하지만, 세포-표면 만노스-6-인산염 수용체는 라이소좀에 이들 효소를 결합, 내재화 및 전달할 수 있다. 제조함 IDUA(알두라자임(Aldurazyme)(등록상표), 바이오마린(BioMarin))은 MPS I의 혈러 및 혈러-샤이에 형태를 갖는 환자에 대해 그리고 중등증 내지 중증의 증상을 갖는 샤이에 형태를 갖는 환자에 대해 FDA에 의해 승인되어 있고, 폐기능 및 보행 기능을 개선시키는 것으로 나타났다. ERT는 또한 MPS I 환자에서 간비대뿐만 아니라 소변 GAG의 수준을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 그러나, 정맥내 효소는 뇌 내로 용이하게 가로지르지 못 하기 때문에, ERT는 현재 일부 MPS I 환자에 의해 경험되는 신경학적 증상을 해결하지 못한다.

[0009] ERT의 합병증은 경증 내지 완전한 아나필락시스뿐만 아니라 평생 동안의 말초 접근, 예컨대 국소 및 전신 감염의 합병증의 범위일 수 있는 재조합 효소에 대한 면역 반응을 중심으로 삼는다. 알두라자임을 받는 환자의 최대 91%는 그것이 효능에 얼마나 영향을 미치는지는 분명하지 않지만, 효소에 대한 항체를 발생시킨다. 더 나아가, ERT는 병원 시설에서 3 내지 8시간의 기간에 걸쳐 투여되는 매주 i.v. 주입을 필요로 하는데, 이는 환자의 삶의 질에 상당히 영향을 미치며, 고비용일 때 건강관리 상환 시스템에 대한 주된 부담이 된다.

[0010] 이들 제한에 비추어, MPS I와 관련된 이환율을 더 효과적으로 수정할 수 있는 치료는 충족되지 않은 필요로 남아있다.

발명의 내용

[0011] I형 점액다당류증(MPS I)으로 진단된 환자(인간 대상체)의 CNS에 인간 알파-L-이두로니다제(hIDUA) 유전자를 전달하기 위한 복제 결함 아데노 연관 바이러스("AAV")가 본 명세서에 제공된다. hIDUA 유전자("rAAV.hIDUA")를 전달하기 위해 이용되는 재조합 AAV("rAAV") 벡터는 CNS에 대한 친화성을 가져야 하며(예를 들어, AAV9 캡시드를 보유하는 rAAV), 그리고 hIDUA 이식유전자는 특정 발현 제어 요소, 예를 들어, 거대세포바이러스(시토크갈로 바이러스: CMV) 인핸서와 닭 베타 액틴 프로모터(CB7)의 혼성체에 의해 제어되어야 한다. 척추강내/낭내 투여에 적합한 약제학적 조성물은 생리적으로 적합한 수성 완충제, 계면활성제 및 선택적 부형제를 포함하는 제형 완충제 중에 rAAV.hIDUA 벡터의 현탁액을 포함한다. rAAV 현탁액은 추가로 하기를 특징으로 한다:

[0012] 인간 환자에서 알파-L-이두로니다제 결핍증의 치료를 위해 유용한 치료 요법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 요법은 환자에게 다음을 투여하는 것을 포함한다: (a) AAV9 캡시드를 갖고 환자에서 직접적인 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에서 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 갖는 재조합 AAV(rAAV)로서, 인간 hIDUA 암호화 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 기능성 hIDUA를 암호화하는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 갖는 rAAV, (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택된 적어도 제1 면역 억제제: 및 (c) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택된 적어도 제2 면역 억제제로서, 적어도 하나의 면역 억제제의 투여는 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고, 면역 억제제 중 적어도 하나의 투여는 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다. 환자는 처음에 정맥내로 스테로이드에 이어서 경구로 스테로이드가 투약될 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제는 1종 이상의 코르티코스테로이드이고, 선택적으로는 마이코페놀레이트 모페틸(MMF), 및/또는 1종 이상의 마이크로라이드이다. 1종 이상의 마이크로라이드는 칼시뉴린 저해제(예를 들어, 타크롤리무스), mTOR 저해제(예를 들어, 시롤리무스, 템시롤리무스, 에버롤리무스, 또는 또 다른 라파로그), 또는 이들의 조합일 수도 있다. 특정 실시형태에서, 환자에게 스테로이드를 투약하는 것은 벡터 벡터 투약 후 12주에 중단된다. 특정 실시형태에서, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스는 벡터 투여 전 0 내지 15일 동안 전달된다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제는 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 시롤리무스이다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제가 타크롤리무스 및 시롤리무스를 모두 포함할 때, 각각의 작은 용량이 약 4 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 또는 총 약 8 ng/mL 내지 약 16 ng/mL의 혈액 트로프 수준을 유지하는데 이용된다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제가 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 1종만을 포함할 때, 총 용량은 약 16 ng/mL 내지 약 24 ng/mL의 범위에 있다. 특정 실시형태에서, 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 1종만이 이용되면, 초기 장입 용량은 약 3 mg/m^2 이다. 특정 실시형태에서, 면역 억제 요법은 벡터 투여 전 대략 -제14 일 내지 -제1 일에 시작된다. 특정 실시형태에서, 암호화된 hIDUA는 다음으로부터 선택된 서열을 갖는다: (a) 서열 번호 2의 아미노산 약 1 내지 약 653(젠뱅크 NP_000193); 및 (b) 서열 번호 2의 산 약 27 내지 약 653에 융합된 이중성 리더 서열을 포함하는 합성 인간 효소. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 5' 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR) 서열, 닭 베타 액틴 인트론, CB7 프로모터, 폴리 A 신호, 및/또는 3' ITR 서열을 더 포함한다. 특정 실시형태에서, rAAV는 6 내지 9의 pH를 갖는 현탁액 중에 있다. 특정 실시형태에서, rAAV는 척추강내주사를 통해 전달된다. 특정 실시형태에서, hIDUA 유전자를 포함하는 rAAV는 정맥내로 투약된다. 특정 실시형태에서, 요법의 효능은 선택적으로 청각 뇌간 테스트에 의해 청각 능력 변화를 측정함으로써 평가된다. 특정 실시형태에서, rAAV는 다음의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 인간 대상체로의 척추강내 주사를 위해 제형화된다: (i) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} GC; (ii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} GC; (iii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} GC 또는 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} GC.

[0013] 다음의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 필요로 하는 인간 대상체로의 척추강내 주사를 위해 제형화된, 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 조성물이 제공된다: (a) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} GC; 또는 (b) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} GC 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} GC; 또는 (c) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} GC 또는 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} GC. 특정 실시형태에서, 인간 hIDUA 암호화 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 기능성 hIDUA를 암호화하는, 서열 번호 1에 대해 적어

도 약 80% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 조성물은 다음과의 공동 요법을 이용하였다: (i) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 1종으로부터 선택된 적어도 제1 면역 억제제 및 (ii) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 1종으로부터 선택된 적어도 제2 면역 억제제로서, 면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고, 면역 억제제 중 적어도 하나의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다.

[0014] 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 AAV 벡터와의 조합 요법에서 이용을 위한 면역 억제제가 제공된다. 특정 실시형태에서, 인간 hIDUA 암호화 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 기능성 hIDUA를 암호화하는, 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제는 다음을 포함한다: (a) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 1종으로부터 선택된 적어도 제1 면역 억제제를 포함하는 조성물; 및 (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 1종으로부터 선택된 적어도 제2 면역 억제제를 포함하는 조성물로서, 면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고; 면역 억제제 중 적어도 1종의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다. 특정 실시형태에서, AAV 벡터는 다음의 전체 고른 용량을 투여하기 위해 필요로 하는 인간 대상체에게 척추강내 주사를 위해 제형화된다: (i) 4개월 이상 9개월 미만의 인간 대상체에게 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} GC 또는 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} GC; 또는 (ii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{13} GC 또는 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} GC; 또는 (iii) 9개월 이상 18개월 미만의 인간 대상체에게 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} GC 또는 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} GC.

[0015] 이러한 rAAV.hIDUA 벡터 제제는 CNS에서 hIDUA 발현의 치료 수준을 달성하기 위해 척추강내/낭내 주사에 의해 인간 대상체에게 투여될 수 있다. 치료를 위한 후보인 환자는 MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에와 관련된 증상을 갖는 소아 및 성인 환자이다.

[0016] 이러한 rAAV.hIDUA 벡터 제제는 CNS에서 hIDUA 발현의 치료 수준을 달성하기 위해 척추강내/낭내 주사에 의해 인간 대상체에게 투여될 수 있다. 치료를 위한 후보인 환자는 MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에와 관련된 증상을 갖는 소아 및 성인 환자이다.

[0017] MPSI 환자에 대한 AAV.hIDUA의 치료적으로 유효한 척추강내/낭내 용량은 약 1×10^{11} 내지 7.0×10^{14} GC(고른 용량)(10^9 내지 5×10^{10} GC/g 환자의 뇌질량과 동등함)의 범위이다. 대안적으로, 다음의 치료적으로 유효한 고른 용량은 표시된 연령 그룹의 환자에게 투여될 수 있다:

[0018] · 신생아: 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0019] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0020] · 9개월 내지 6세: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0021] · 3 내지 6세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0022] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0023] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;

[0024] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.

[0025] 다른 실시형태에서, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량이 다음 나이 그룹의 MPS 환자에게 투여된다:

[0026] · 신생아: 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC;

[0027] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

- [0028] · 9 내지 36개월: 약 10^{13} 내지 약 5×10^{13} GC;
- [0029] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0030] · 3 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0031] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;
- [0032] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.
- [0033] 특정 실시형태에서, 이들 범위 중 하나 이상이 1.2×10^{12} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량)의 용량으로 임의의 나이의 환자에게 이용되거나 또는 6×10^{12} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)가 4개월 이상 내지 9개월 미만의 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1.1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 6.0×10^{12} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 3×10^{13} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 4개월 이상 내지 9개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.0×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.0×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.1×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.5×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.6×10^{12} 개의 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.3×10^{13} (GC)(1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에 투여되는 용량은 1.4×10^{13} 개의 게놈 복제물(GC)(1.1×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에 투여되는 용량은 7×10^{13} GC(5.6×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 또한 추가 실시형태에서, MPSI 환자에게 투여되는 용량은 적어도 약 4×10^8 개의 GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량이다. 특정 실시형태에서, MPS I 신생아에게 투여되는 용량은 약 1.4×10^{11} 내지 약 1.4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; 3 내지 9개월 영아에게 투여되는 용량은 약 2.4×10^{11} 내지 약 2.4×10^{14} 개의 GC의 범위이며; MPS I 9 내지 36개월 어린이에게 투여되는 용량은 약 4×10^{11} 내지 약 4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; MPS I 3 내지 12세 어린이에게 투여되는 용량은 약 4.8×10^{11} 내지 약 4.8×10^{14} 개의 GC의 범위이며; 12+세의 어린이 및 성인에게 투여되는 용량은 약 5.6×10^{11} 내지 약 5.6×10^{14} 개의 GC의 범위이다.
- [0034] 치료 목표는 질환을 치료하기 위해 rAAV-기반 CNS-관련 유전자 요법을 통해 환자의 결함있는 알파-L-이두로니다제를 기능적으로 대체하는 것이다. 요법의 효능은 (a) MPSI를 갖는 환자에서 신경인지 쇠퇴의 예방; 및 (b) 질환의 바이오마커, 예를 들어, CSF, 혈청 및/또는 소변, 및/또는 간 및 비장 용적에서 GAG 수준 및/또는 IDUA 또는 헥소사미니다제(Hex) 효소 활성의 감소를 평가함으로써 측정될 수 있다. 신경인지는, 예를 들어, 혈류 대상체에 대한 베일리의 영아 발달 척도(Bayley's Infantile Development Scale)에 의해 측정하여 또는 혈류-샤이에 대상체에 대한 웨슬러 약식 지능 검사(Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence: WASI)에 의해 측정하여 지능지수(IQ)를 측정함으로써 결정될 수 있다. 신경인지 발달 및 기능의 다른 적절한 측정은, 예를 들어, 베일리 영아 발달검사(BSID-III)를 이용하는 발달지수(developmental quotient: DQ) 평가, 홉킨스 언어 학습 검사를 이용하고/하거나 주의력 검사(Tests of Variables of Attention: TOVA)를 이용하는 기억 평가가 이용될 수 있다. 청각 능력 변화는 청각 뇌간 반응(ABR) 검사에 의해 측정된다.
- [0035] 치료 전에, MPSI 환자는 hIDUA 유전자를 전달하기 위해 이용되는 rAAV 벡터의 캡시드에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 이러한 Nab는 형질도입은 형질도입 효율을 방해할 수 있고 치료 효능을 감소시킨다. 기준

혈청 Nab 역가 $\leq 1:5$ 인 MPS I 환자는 rAAV.hIDUA 유전자 요법 프로토콜을 이용하는 치료를 위한 양호한 후보이다. 혈청 Nab $>1:5$ 의 역가를 갖는 MPS I 환자의 치료는 조합 요법, 예컨대 rAAV.hIDUA 벡터 전달을 이용하는 치료 전에 및/또는 동안에 면역 억제제와 함께 일시적 공동 치료를 필요로 할 수 있다. 선택적으로, 면역 억제성 공동 요법은 AAV 벡터 캡시드 및/또는 제형의 다른 성분들에 대한 중화 항체의 선행 평가 없이 예방 측정으로서 이용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 선행 면역 억제 요법은 특히 사실상 IDUA 활성 수준이 없는 환자에서 hIDUA 이식유전자 산물에 대한 잠재적 유해 면역 반응을 방지하는 데 바람직할 수 있으며, 여기서 이식유전자 산물은 "외래"로서 보일 수 있다. 이하의 실시예에 기재된 마우스, 개 및 NHP에서 비임상 연구의 결과는 hIDUA 및 신경염증에 대한 면역 반응의 발생과 일치된다. 인간 대상체에서 유사한 반응이 일어나지 않을 수도 있지만, 예방책으로서 면역 억제 요법이 rAAV-hIDUA의 모든 수용자에 대해 권장된다.

[0036] hIDUA의 전신 전달에 의해 수반되는 CNS에 대한 rAAV.hIDUA의 유전자 요법 전달의 조합은 본 발명의 방법에 의해 포함된다. 전신 전달은 ERT(예를 들어, 알두라자임(등록상표)를 이용), 또는 간에 대한 친화성을 갖는 rAAV.hIDUA(예를 들어, AAV8 캡시드를 보유하는 rAAV.hIDUA)를 이용하는 추가적인 유전자 요법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0037] 특정 실시형태에서, 환자는 환자의 hIDUA에 대한 용 용도(tolerize)를 위해 간-관련 주사를 통해 AAV.hIDUA가 투여되고, 환자가 영아, 어린이, 및/또는 성인일 때 환자는 척추강내/낭내 주사를 통해 AAV.hIDUA가 후속적으로 투여되어 CNS에서 hIDUA의 치료적 농도를 나타낸다.

[0038] 본 발명의 이점은 이하의 실시예에 의해 예시되는데, 이는 동물 연구에서 rAAV9.IDUA의 IT 투여가 CNS 내에서 벡터의 광범위한 분포를 야기한다는 것을 입증한다. 게다가, fIDUA, cIDUA 또는 hIDUA를 전달하는 rAAV9 벡터의 단일 용량은 3 내지 7개월 고양이와 1개월 개 동물 모델 둘 다에서 CNS-관련 MPS I의 조직학적 및 생화학적 징후를 용량 의존적으로 개선시키거나 또는 완전히 반전시키는 데 성공적이었다. 유사하게, 주사 후 적어도 2년 동안 영아로서 주사될 때를 포함하여, rAAV9.IDUA의 단일 IT 용량은 마카크에서 임상적으로 잘 용인되었다. 동물에서 rAAV9.IDUA 투여와 관련된 유해 효과만이 시험한 모든 종에 걸쳐 이식유전자에 대한 면역 반응과 관련되었다.

[0039] 실시예에 나타내는 바와 같이, rAAV9.IDUA 치료의 유리한 효과는 항-IDUA 항체 반응의 발생에 의해 제한되었다. 관용 유도되지 않은 MPS I 개(실시예 3) 또는 레서스 마카크(실시예 7) 중 하나에서 평가한 최고 용량에서 유해 효과가 관찰되었다. 변화 및 개시 시간의 특징은 이들 효과가 이식유전자 산물에 대한 면역학적 반응에 의해 매개되었다는 것을 나타낸다. 실시예 3에서, 최고 용량에서 개들은 둘 다 통증 및 뒷다리 쇠약을 수반하는 높은 CSF WBC 계수 및 단백질 수준을 가진다. 이들 동물은 운동 및 감각 뉴런에서 발견되는 이식유전자에 대한 면역학적 반응에 기인하는 척수 및 배근 신경절에서 조직병리학적 병변을 가지며, 이는 동물에서 더 낮은 2 용량으로는 관찰되지 않았다. 레서스 마카크에서의 독성 연구에서(실시예 7), hIDUA에 대한 체액성과 세포-매개 면역학적 반응이 둘 다 관찰되었고, CSF에서의 증가된 유핵 세포 수 및 항-IDUA 항체, 및 말초혈액에서의 약한 항-IDUA T-세포 반응을 특징으로 한다. 개와 달리, 유해 임상 징후는 일어나지 않았으며, 척수 내의 신경 괴사는 관찰되지 않았고, 원숭이는 치료를 용인하는 것으로 나타났다. 그러나, 백질 후삭에서의 양쪽 축삭 퇴행으로 이루어진 CNS 병변이 제90 일 및 제180 일에 척수에서 관찰되었다. 이들 축삭 변화는 배근 신경절에서 뉴런에 대해 면역학적으로 매개된 효과에 대해 2차성인 것으로 고려된다.

[0040] 비임상 중에서 관찰되는 인간 단백질에 대해 획득된 면역학적 반응은 인간에서 동일한 반응의 특성 또는 규모 중 하나를 예측하지 못할 수도 있다. 그럼에도, 바람직한 실시형태에서, 인간 대상체, 특히 임의의 hIDUA를 발현시키지 않은 개체는 면역 억제제로 예방적으로 치료되어야 하고 따라서 이 효소에 대해 용인되는 것으로 예상되지 않는다. 이하의 실시예의 데이터는 rAAV9.IDUA 작제물의 투여 전 cIDUA 또는 hIDUA 중 하나에 대해 관용 유도된 신생아 개 및 비인간 영장류에서, 지속적인 형질도입 및 IDUA 발현이 달성되었다. 대조적으로, IDUA에 대해 이전에 관용 유도되지 않은 동물은 일반적으로 IDUA와 AAV9 캡시드 항원 둘 다에 대해 면역 반응을 시작하였다. 종합하면, 실시예의 데이터는 면역 억제성 치료가 또한 rAAV9.IDUA의 효능을 향상시킬 수 있었다는 것을 나타낸다.

[0041] 일부 실시형태에서, rAAV9.IDUA를 받는 대상체는 또한

[0042] 코르티코스테로이드(제1 일 예비 투여시 메틸프레드니솔론 10 mg/kg IV 및 제2 일에 0.5 mg/kg/day로 시작하여 점감한 다음 제12 주까지 중단되는 경구용 프레드니손), 표적 혈액 수준은 4 내지 8 ng/mL이고 제24 주 내지 제32 주 간 8주에 걸쳐 점감되는 타크롤리무스(PO 제2 일 내지 제24 주 사이에 1.0 mg 1일 2회), 및 시롤리무스(1 mg/m²의 장입 용량을 -제2 일에 4시간 마다 x 3회 투여 후 이어서 -제1 일부터 시롤리무스를 0.5 mg/m²/day로 1

일 2회 나누어서 투약하고, 제48 주까지 표적 혈액 수준은 4 내지 8 ng/ml이다)로 이루어진 IS 요법을 받는다. 일부 실시형태에서, 초기 조합 면역 억제 요법은 순차적으로 감소되어 먼저 프레드니손을 중단한 후 타크롤리무스를 중단하고 마지막으로 시롤리무스를 중단할 것이다.

[0043] 본 발명의 또 다른 양상 및 이점은 본 발명의 상세한 설명으로부터 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 내로 패키징되는 벡터 게놈의 개략도를 도시한 도면. 벡터 게놈에서, AAV 5' 및 3' 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR) 벡터 게놈에 축적하는 발현 카세트의 주된 성분이 도시된다. 이들은 거대세포바이러스 급초기 인핸서, CB7 프로모터, 키메라 인트론, 인간 알파-L-이두로니다제 암호화 서열(유전자), 및 토끼 베타 글로빈 폴리 A 신호를 포함한다.

도 2A 및 도 2B는 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9에 의한 척추강내 주사로 치료된 미경험(도 2A) 또는 관용 유도(도 2B) MPS I 개에서 CSF IDUA 활성을 나타낸 도면. 개는 대조(cisterna magna) 내로 벡터의 척추강내 주사에 의해 1개월령에 치료되었다. IDUA 활성이 후속적 CSF 샘플에서 측정되었다. 벡터 용량(GC/kg)을 각각의 동물에 대해 나타낸다. 파선은 척추강내 벡터 단독으로 치료한 동물을 나타낸다. 속이 찬 기호와 함께 실선은 출생 후 제5 일에 간-특이적 프로모터로부터 인간 IDUA를 발현시키는 정맥내 AAV8로 전처리한 동물을 나타낸다. 속이 빈 기호와 함께 실선은 출생 후 제7 일 및 제14 일에 재조합 인간 IDUA의 정맥내 주입으로 전처리한 동물을 나타낸다. 동물 I-665 및 I-666은 신경학적 징후에 기인하여 제36 일에 안락사시켰다. 수평 파선은 정상 개에서 평균 CSF IDUA 활성을 나타낸다. 점선은 정량화의 분석 한계를 나타낸다.

도 3은 인간 IDUA에 대한 CSF 항체 역가를 나타낸 도면. 인간 IDUA에 대한 항체 역가를 벡터 투여 후 50일에 수집한 CSF 샘플에서 ELISA에 의해 측정하였다. I-665 및 I-666으로부터 시험한 CSF 샘플을 부검 시 수집하였다(주사 후 제36 일). 오차 막대 = SEM. 항체 역가는 IT 벡터 단독(I-604, I-608, I-605, I-665, I-666)으로 치료한 대조군에 비해 AAV8 벡터(I-652, I-653, I-602, I-607, I-601, I-606) 또는 재조합 인간 IDUA(I-663, I-664)로 신생아로서 전처리한 동물에서 상당히 더 낮았다(맨-휘트니 검정).

도 4A 및 도 4B는 척추강내 AAV9 주사 후 CSF 유핵 세포 수를 나타낸 도면. 척추강내 AAV9로 치료한 미경험 개(도 4A)뿐만 아니라 신생아로서 전신 재조합 인간 IDUA(I-663 및 I-664) 또는 척추강내 AAV9를 받기 전에 IDUA를 발현시키는 AAV8 벡터로 치료한 동물(도 4B)로부터의 CSF 샘플에서 총 유핵 세포 수를 측정하였다. 신생아로서 AAV8 벡터 또는 재조합 인간 IDUA로 전처리한 것에 비해 미경험 동물에서 벡터 주사 후 제21 일에 유핵 세포 수는 상당히 상승되었다(맨-휘트니 검정).

도 5는 척추강내 AAV9로 치료한 인간 IDUA 관용 MPS I 개에서 뇌 핵소사미니다제 활성의 정규화를 도시한 도면. Hex 활성은 6개의 뇌 영역(전두 피질, 측두엽 피질, 후두피질, 해마, 연수 및 소뇌)으로부터 수집한 샘플에서 측정되었다. 평균 활성은 정상 대조군 개, 비치료 MPS I 개 및 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9의 척추강내 주사로 치료한 8마리의 hIDUA 관용 개에 대해 나타낸다. 속이 빈 기호는 재조합 인간 IDUA의 주입에 의해 관용 유도된 동물을 나타낸다. Hex 활성은 비치료 대조군에 비해 고용량 코호트에서 상당히 감소되었다(크루스칼-왈리스 검정(Kruskal-Wallis test) 다음에 둔의 다중 비교 검정(Dunn's multiple comparisons test)).

도 6A 및 도 6B는 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9의 척추강내 주사로 치료한 인간 IDUA 관용 개에서 뇌 저장 병변의 용량-의존적 교정을 도시한 도면. 뇌를 절편화하고 나서, LIMP2 및 GM3으로 염색하였다. 알시안 블루(Alcian blue) 염색을 이용하여 수막 GAG 축적을 영상화하였다. 피질 뇌 영상에 대해 GM3(도 6A) 및 LIMP2(도 6B) 양성 세포의 자동화된 정량화를 수행하였다(n = 10/동물). 속이 빈 기호는 재조합 인간 IDUA의 주입으로 관용 유도된 동물을 나타낸다. GM3 및 LIMP2는 비치료 대조군에 비해 고용량 코호트에서 상당히 감소되었다(크루스칼-왈리스 검정 다음에 둔의 다중 비교 검정).

도 7은 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9의 척추강내 주사로 치료한 미경험 개에서 뇌 핵소사미니다제 활성의 부분적 정규화를 도시한 도면. 핵소사미니다제 활성은 6개의 뇌 영역(전두 피질, 측두엽 피질, 후두피질, 해마, 연수 및 소뇌)으로부터 수집한 샘플에서 측정되었다. 평균 활성은 정상 대조군 개, 비치료 MPS I 개 및 10^{12} GC/kg 또는 10^{11} 개의 GC/kg의 용량으로 1개월령에 인간 IDUA를 발현시키는 척추강내 AAV9로 치료한 개에 대해 나타낸다.

도 8은 hIDUA 관용 개에서 IT AAV9 치료 후 CSF 핵소사미니다제 활성의 정규화를 도시한 도면. 연구의 종료 시 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 MPS I 개의 CSF에서 Hex 활성을 측정하였다. 속이 빈 기호는 재조합 인간 IDUA의

주입으로 관용 유도된 동물을 나타낸다. CSF hex 활성은 비치료 MPS I 대조군에 비해 모든 치료 동물에서 상당히 감소되었다(맨-휘트니 검정).

도 9는 인간 IDUA를 발현시키는 척추강내 AAV9로 치료한 hIDUA 관용 개에서 경추 내막 비후화의 분해능을 도시한 도면. 뇌척수막의 평균 총 두께를 경부 척수의 H&E 염색 절편 상에서 측정하였다. 속이 빈 기호는 재조합 인간 IDUA의 주입으로 관용 유도된 동물을 나타낸다. 뇌척수막 두께는 비치료 MPS I 대조군에 비해 모든 치료 동물에서 상당히 감소되었다(맨-휘트니 검정).

도 10A 및 도 10B는 IT AAV9로 치료한 MPS I 마우스에서 효소 발현과 뇌 저장 병변의 교정의 비교를 제공하는 도면. MPS I 마우스를 2 내지 3개월령에 세 가지 중 하나의 용량으로의 AAV9.CB.hIDUA의 ICV 주사로 치료하였다: 3×10^8 개의 GC(저), 3×10^9 개의 GC(중), 또는 3×10^{10} 개의 GC(고). 도 10A는 벡터 주사 후 3주에 희생시킨 동물의 하나의 코호트로부터 유래되며, IDUA 활성의 측정을 위해 뇌를 채취하였다. 도 10B는 주사 후 3개월에 희생시킨 동물의 제2 코호트를 나타내고; 뇌를 라이소좀 막 단백질 LIMP2에 대해 염색하였다. LIMP2에 대해 양성인 세포 염색을 4개의 피질 뇌 절편에서 맹검 검토자에 의해 정량화하였다. * $p < 0.05$, 일원 ANOVA 다음에 던넛 검정(Dunnett's test).

도 11은 제조 공정 흐름 다이어그램을 제공하는 도면.

도 12는 공축 삽입 방법을 위한 광학적 삽입기 니들(28)을 포함하고, 10 cc 벡터 주사기(12), 10cc 사전충전 플러시 주사기(14), T-커넥터 연장 세트(관(20), 관 단부의 클립(22) 및 커넥터(24)를 포함함), 22G x 5" 스파이날 니들(26), 광학적 18G x 3.5" 삽입기 니들(28)을 포함하는, 약제학적 조성물의 낭내 전달을 위한 장치(10)의 영상을 도시한 도면. 또한 수(male) 루어락(16)과 교접하는 4-원 멈춤 꼭지가 도시된다.

도 13은 낭내 주사의 개략적 도시를 제공하는 도면.

도 14는 ICV AAV9로 치료한 개에서 뇌염 및 이식유전자 특이적 T 세포 반응을 도시한 도면. 1세 MPS I 개를 GFP를 발현시키는 AAV9 벡터의 단일 ICV 또는 IC 주사로 치료하였다. 주사 후 12일에 죽은 것을 발견한 I-567을 제외하고 모든 동물을 주사 후 14일에 희생시켰다. 뇌를 관상면 절편으로 나누었는데, 이는 ICV 치료 동물에서 주사 부위 근처의 중대한 병변(화살촉)을 나타내었다. 중대한 병변을 둘러싼 뇌 영역으로부터의 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 부검 시 하나의 ICV 치료 개(I-565)로부터 말초 혈액 단핵구 세포를 수집하고 나서, AAV9 캡시드 및 GFP 단백질에 대한 T 세포 반응을 인터페론- γ ELISPOT에 의해 측정하였다(도 14). 전체 GFP 서열을 아우르는 중복 15개 아미노산 길이 펩타이드의 단일 풀을 이용하여 GFP 이식유전자 산물에 대한 T 세포 반응을 측정하였다. AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 펩타이드를 3개의 풀(풀 A 내지 C로 표기)로 나누었다. * = 양성 반응, 3배 초과 배경(비자극 세포) 및 백만개의 세포 당 55개 초과 스팟으로서 정의함. 포볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)와 함께 피토헤마글루티닌(Phytohemagglutinin: PHA) 및 이오노마이신은 T 세포 활성화를 위한 양성 대조군으로서 작용한다.

도 15는 ICV 또는 IC AAV9로 치료한 개에서 벡터 생체내 분포를 도시한 막대 그래프를 도시한 도면. 주사 후 12일에 부검한 동물 I-567을 제외하고 GFP를 발현시키는 AAV9 벡터의 단일 ICV 또는 IC 주사에 의한 주사 후 14일에 개를 희생시켰다. 정량적 PCR에 의해 조직 샘플에서 벡터 게놈을 검출하였다. 값을 이배체 세포 당 벡터 게놈 복제물(GC/이배체 게놈)로서 표현한다. 해마 또는 대뇌 피질로부터 수집한 뇌 샘플은 ICV 치료 개에 대해 주사 또는 비주사 반구로서 나타내고; IC 치료 동물에 대해, 이들은 각각 좌 및 우반구이다. 동물 I-567의 주사된 뇌 반구로부터의 PCR에 대해 샘플을 수집하지 않았다.

도 16은 척추강내 AAV9로 치료한 NHP에서 벡터 생체내 분포를 나타내는 막대 그래프를 도시한 도면. 5mL 이오헥솔 180 중에서 희석시킨 AAV9 벡터의 요추 천자를 통한 척추강내 주사 후 14일에 NHP를 희생시켰다. 동물 중 2마리를 주사 후 10분 동안 트렌델렌버그(Trendelenburg) 위치에 두었다. 정량적 PCR에 의해 조직 샘플에서 벡터 게놈을 검출하였다. 값을 이배체 세포 당 벡터 게놈 복제물(GC/이배체 게놈)로서 표현한다.

도 17A 및 도 17B는 MPS I에서 상승된 CSF 스퍼민을 도시한 도면. MPS I 개($n = 15$) 및 정상 대조군($n = 15$)으로부터의 CSF 샘플 상에서 고속 대량 LC/MS 및 GC/MS 대사물질 선별을 수행하였다. 도 17A는 상위 100개의 차별적으로 검출된 대사물질의 열지도를 나타낸다(ANOVA). MPS I 코호트(28일령)에서 가장 어린 동물은 별표로 표시한다. 도 17B는 MPS I 및 2 정상 영아와 함께 6명의 영아로부터의 CSF 샘플에서 정량적 동위원소 희석 LC/MS 분석에 의해 측정된 스퍼민 농도를 나타내는 그래프이다.

도 18A 내지 도 18F는 MPS I 뉴런에서 스퍼민 의존적 비정상적 신경돌기 성장을 도시한 도면. E18 야생형 또는

MPS I 마우스 배아로부터 채취한 피질 뉴런을 플레이팅 24시간 후에 스퍼민(50ng/mL) 또는 스퍼민 신타제 저해제 APCHA로 처리하였다. 맹검 검토자에 의해 처리 조건 당 2회 배양물로부터의 45 내지 65개의 무작위 선택 뉴런에 대해 신경돌기 수, 길이 및 분지를 정량화하였다. 도 18A는 야생형에 비해 MPSI, MPSI + APCHA, 또는 MPSI+APCHA+스퍼민에 대해 신경돌기를 제공하는 막대 그래프이다. 도 18B는 야생형에 비해 MPSI, MPSI + APCHA, 또는 MPSI+APCHA+스퍼민에 대해 분지점을 제공하는 막대 그래프이다. 도 18C는 야생형에 비해 MPSI, MPSI + APCHA, 또는 MPSI+APCHA+스퍼민에 대해 아버(arbor) 길이를 제공하는 막대 그래프이다 *** $p < 0.0001$ (ANOVA 다음에 던벳 검정). 도 18D는 야생형에 비해 스퍼민으로 처리한 야생형에 대해 신경돌기/세포를 비교하는 막대 그래프이다. 도 18E는 야생형에 비해 스퍼민으로 처리한 야생형에 대해 분지점/세포를 비교하는 막대 그래프이다. 도 18F는 야생형에 비해 스퍼민으로 처리한 야생형에 대해 아버 길이/세포를 비교하는 막대 그래프이다.

도 19A 내지 도 19C는 유전자 요법 후 MPS I 개에서 CSF 스퍼민 수준 및 뇌 GAP43 발현의 정규화를 도시한 도면. 5마리의 MPS I 개를 1개월령에 개 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터의 척추강내 주사로 치료하였다. 일부 MPS I 개에서 IDUA에 대해 유발된 항체 반응을 방지하기 위해 개 중의 2마리(I-549, I-552)를 출생 후 제1 일에 간 관련 유전자 요법에 의해 IDUA에 대해 관용 유도하였다. 도 19A는 척추강내 벡터 주사 6개월 후에 뇌 조직에서 측정된 IDUA 활성의 결과를 나타내는 막대 그래프이다. 도 19B 및 도 19C는 농도측정에 의해 β -액틴에 대해 정량화한 피질 뇌 샘플에서 GAP43의 측정 후 결과를 나타내는 그래프이다. 동위원소 희석 LC/MS(E)에 의한 희생시 CSF 스퍼민을 측정하였다. 미처리 MPS I 개($n = 3$) 및 정상 개($n = 2$)는 대조군으로서 작용한다. * $p < 0.05$ (크루스칼-왈리스 검정 다음에 튜의 검정).

도 20A 및 도 20B는 MPS I에서 CNS 관련 유전자 요법의 평가를 위한 CSF 바이오마커로서 스퍼민의 이용을 도시하는 그래프를 도시한 도면. 출생 시 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 6마리의 MPS I 개를 1개월령에 인간 IDUA를 발현시키는 척추강내 AAV9로 치료하였다(1012개의 GC/kg, $n = 2$, 1011 GC/kg, $n = 2$, 1010개의 GC/kg, $n = 2$). 도 20A는 치료 6개월 후에 측정된 CSF 스퍼민 수준의 측정 후 결과를 제공한다. 3마리의 MPS I 고양이를 고양이 IDUA를 발현시키는 척추강내 AAV9(1012 GC/kg)로 치료하였다. 도 20B는 치료 6개월 후에 CSF 스퍼민의 정량화 후 결과를 제공한다. 미처리 MPS I 개($n = 3$) 및 정상 개($n = 2$)는 대조군으로서 작용한다.

도 21은 무작위 숲 분석에 의해 동정된 대사물질에 대한 평균 감소 정확도를 도시한 도면.

도 22 및 23은 실시예 7에서 기재된 AAV9.hIDUA 벡터를 이용하여 비-인간 안전성 연구로부터의 데이터를 제공하는 도면.

도 22는 제0 일 내지 제90 일에 면역 억제되지 않은(IS 아님) 그리고 면역 억제된(IS) 비-인간 영장류로부터의 혈청 및 뇌척수액을 도시하는 도면. 범례의 숫자는 개개의 동물을 반영한다.

도 23은 면역 억제(IS)되거나 면역 억제되지 않는 여부에 관계없이, 고용량(HD)에서 T 세포 면역 반응에 대한 면역 억제의 영향을 도시하는 도면. ElisSpot을 벡터 캡시드(AAV9) 및 이식유전자(hIDUA)에 대하여 실행하였다. 세포를 나타난 바와 같이 자극하였다. 결과는 스폿 형성 단위(SFU)/백만개의 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC)로 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] I형 점액다당류증(MPS I)으로 진단된 환자(인간 대상체)의 CNS에 인간 알파-L-이두로니다제(hIDUA) 유전자를 전달하기 위한 복제 결함 아데노 연관 바이러스("AAV")가 본 명세서에 제공된다. hIDUA 유전자("rAAV.hIDUA")를 전달하기 위해 이용되는 재조합 AAV("rAAV") 벡터는 CNS에 대한 친화성을 가지며(예를 들어, AAV9 캡시드를 보유하는 rAAV), hIDUA 이식유전자는 특정 발현 제어 요소, 예를 들어, 거대세포바이러스(CMV) 인핸서와 닥 베타 액틴 프로모터(CB7)의 혼성체에 의해 제어된다. 특정 실시형태에서, 척추강내, 낭내 및 전신 투여에 적합한 약제학적 조성물이 제공되는데, 이는 생리적으로 적합한 수성 완충제, 계면활성제 및 선택적 부형제를 포함하는 제형 완충제 중에 rAAV.hIDUA 벡터의 현탁액을 포함한다. rAAV 현탁액은 추가로 하기를 특징으로 한다:
- [0046] (i) rAAV 게놈 복제물(Genome Copy: GC) 역가는 적어도 1×10^9 개의 GC/mL 내지 1×10^{14} 개의 GC/mL($\pm 20\%$)이고;
- [0047] (ii) rAAV 비어 있는 입자/차 있는 입자 비율은 SDS-PAGE 분석에 의해 결정하여(실시예 6D 참조) 0.01 내지 0.05이거나(비어 있는 캡시드가 95% 내지 99% 없음), 또는 다른 실시형태에서는 비어 있는 캡시드가 적어도 약 50, 적어도 약 80%, 적어도 약 85% 또는 적어도 약 90%이고; 및/또는
- [0048] (iii) rAAV 현탁액의 적어도 약 4×10^8 개의 GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량의 용량이 효능을

가진다.

- [0049] 효능은 시험관내/세포 배양물 분석, 예를 들어, 실시예 6G에 기재한 시험관내 효능 분석에 의해 측정될 수 있으며, 이때 Huh7 또는 HEK293 세포는 세포 당 rAAV GC의 공지된 다중도에 의해 형질도입되고, 상청액은 형질도입 후 72시간에 IDUA 활성화에 대해 분석한다. hIDUA의 기능(활성) 및/또는 효능은, 예를 들어, 형광원 기질인 4-메틸움베틸페틸 알파-L-이두로나이드를 절단하는 그의 능력에 의해 적합한 시험관내 분석에서 측정될 수 있다. 특정 활성화는 기재한 조건 하에 측정하여 7,500pmol/분/ μ g 초과이다. www.RnDSystems.com의 활성화 분석 프로토콜 참조. 본 명세서에 기재된 것들을 포함하여, 효소 활성을 측정하는 다른 적합한 방법이 기재되었다[예를 들어, Kakkis, E. D., *et al* (1994). Protein Expression Purif. 5: 225-232; Rome, L. H., *et al* (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2331-2334 참조]. 또한, 예를 들어, E. Oussoren, *et al*, Mol Genet Metab. 2013 Aug;109(4):377-81. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.05.016. Epub 2013 Jun 4에서 기재된 방법을 이용하여 활성을 평가할 수 있다.
- [0050] 치료를 위한 후보인 환자는 MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에와 관련된 증상을 갖는 소아 및 성인 환자이다.
- [0051] MPSI 환자에 대한 rAAV.hIDUA의 치료적으로 유효한 척추강내/낭내 용량은 약 1×10^{11} 내지 7.0×10^{14} 개의 GC (고른 용량)(10^9 내지 5×10^{10} GC/g 환자의 뇌질량과 동등함)의 범위이다. 대안적으로, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량이 표시된 나이 그룹의 환자에 투여될 수 있다:
- [0052] · 신생아: 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0053] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0054] · 9개월 내지 6세: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0055] · 3세 미만(3세까지의 신생아): 약 1×10^{11} 내지 약 1.2×10^{13} GC
- [0056] · 3 내지 6세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0057] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0058] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;
- [0059] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.
- [0060] 다른 실시형태에서, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량이 다음 나이 그룹의 MPS 환자에게 투여된다:
- [0061] · 신생아: 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC;
- [0062] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0063] · 9 내지 36개월: 약 10^{13} 내지 약 5×10^{13} GC;
- [0064] · 3세 미만(3세까지의 신생아): 약 1×10^{11} 내지 약 1.2×10^{13} GC
- [0065] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0066] · 3 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0067] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;
- [0068] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.
- [0069] 특정 실시형태에서, 이들 범위 중 하나 이상이 임의의 나이의 환자에 이용된다. 특정 실시형태에서, 1.2×10^{12} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 6×10^{12} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른

용량이 4개월 이상 내지 9개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1.1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 6×10^{12} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 3×10^{13} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 4개월 이상 내지 9개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.0×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.0×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.1×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.5×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.6×10^{12} 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.3×10^{13} (GC)(1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에게 투여되는 용량은 1.4×10^{13} 개의 게놈 복제물(GC)(1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량)이다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에게 투여되는 용량은 7×10^{13} 개의 GC(5.6×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량)이다. 또한 추가 실시형태에서, MPSI 환자에게 투여되는 용량은 적어도 약 4×10^8 개의 GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량이다. 특정 실시형태에서, MPS I 신생아에게 투여되는 용량은 약 1.4×10^{11} 내지 약 1.4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; 3 내지 9개월 영아에게 투여되는 용량은 약 2.4×10^{11} 내지 약 2.4×10^{14} 개의 GC의 범위이며; MPS I 9 - 36개월 어린이에게 투여되는 용량은 약 4×10^{11} 내지 약 4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; MPS I 3 내지 12세 어린이에게 투여되는 용량은 약 4.8×10^{11} 내지 약 4.8×10^{14} 개의 GC의 범위이며; 12+세의 어린이 및 성인에게 투여되는 용량은 약 5.6×10^{11} 내지 약 5.6×10^{14} 개의 GC의 범위이다.

- [0070] 치료 목표는 질환을 치료하기 위해 실행 가능한 접근으로서 rAAV-기반 CNS-관련 유전자를 통해 환자의 결함있는 알파-L-이두로니다제를 기능적으로 대체하는 것이다. 본 명세서에 기재된 rAAV 벡터로부터 발현된 바와 같이, CSF, 혈청, 뉴런 또는 다른 조직 또는 유체에서 검출된 바와 같은 정상 수준의 적어도 2%의 발현 수준은 치료 효과를 제공할 수 있다. 그러나, 더 높은 발현 수준이 달성될 수 있다. 이러한 발현 수준은 정상 기능 인간 IDUA 수준의 2% 내지 약 100%일 수 있다. 특정 실시형태에서, CSF, 혈청, 또는 다른 조직 또는 유체에서 정상 발현 수준보다 더 높게 검출될 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또한 rAAV.hIDUA 약제학적 조성물의 제조 및 특성규명을 제공한다(이하 실시예 6 참조).
- [0072] 본 명세서에서 이용되는 용어 "척추강내 전달" 또는 "척추강내 투여"는 그것이 뇌척수액(cerebrospinal fluid: CSF)에 도달하도록 척추관 내로, 더 구체적으로는 지주막하공간 내로 주사를 통한 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다. 척추강내 전달은 요추 천자, 뇌실내, 후두하/낭내, 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자에 의해 지주막하공간 전체적으로 확산을 위해 도입될 수 있다. 다른 예에서, 대조 내로 주사될 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서 이용되는 용어 "낭내 전달" 또는 "낭내 투여"는 뇌실의 또는 대조소뇌연수 내의 뇌척수액 내로 직접적으로, 더 구체적으로는 후두하천자를 통한 또는 대조 내로 직접 주사에 의해 또는 영구적으로 위치한 관을 통한 약물 투여 경로를 지칭한다. 도 13은 낭내 주사가 이루어지는 방법에 관한 도시를 제공한다.
- [0074] 본 명세서에 이용되는 바와 같은, "치료적 유효량"은 MPSI 혈러, 및/또는 혈러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군의 증상 중 하나 이상을 개선시키거나 또는 치료하는데 충분한 효소량을 표적 세포에서 전달하고 발현시키는 AAV9.hIDUA 조성물의 양을 지칭한다. "치료"는 MPSI 증후군 중 하나의 증상의 악화 방지 및 가능하게는 이의 증상 중 하나 이상의 반전을 포함할 수 있다. 치료 유효성(효능)의 평가 방법은 이하에 상세하게 기재된다(예를 들어, 이하의 부분 5.2.3 참조).
- [0075] 인간 환자에 대한 "치료적 유효량"은 동물 모델에 기반하여 예측될 수 있다. 적합한 고양이 모델 및 적합한 개

모델의 예는 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 참고로 포함되는 C. Hinderer et al, *Molecular Therapy* (2014); 22 12, 2018-2027; A. Bradbury, et al, *Human Gene Therapy Clinical Development*. March 2015, 26(1): 27-37 참조. 개 모델에 대해, 개에서의 정맥내 투여는 인간 IDUA에 대한 강한 지속적 항체 반응을 유발하는 것으로 관찰된 반면, 인간환자에서는 투여가 잘 용인되기 때문에, 상기 모델은 전형적으로 면역 억제된 동물 모델, 또는 관용 유도된 동물이다. 이들 모델에서, 특정 증상의 반전이 관찰될 수 있고/있거나 특정 증상의 진행 방지가 관찰될 수 있다. 예를 들어, 각막혼탁의 교정이 관찰될 수 있고 및/또는 중추 신경계(central nervous system: CNS) 내 병변의 교정이 관찰되고 및/또는 혈관주위 및/또는 뇌척수막 교액 저장의 반전이 관찰된다.

[0076] 본 명세서에 이용되는 바와 같은 "기능성 인간 알파-L-이두로니다제"는 MPS1 또는 관련된 증후군, 예컨대 혈러, 혈러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군이 없는 인간에서 정상적으로 기능하는 인간 알파-L-이두로니다제 효소를 지칭한다. 대조적으로, MPS1 또는 이들 증후군 중 하나를 야기하는 인간 알파-L-이두로니다제 효소 변이체는 비기능성인 것으로 간주된다. 일 실시형태에서, 기능성 인간 알파-L-이두로니다제는 Bremer et al, *Mol. Genet. Metab.* 104 (3): 289-294 (2011), 서열번호 2(653개의 아미노산)에서 복제된 NCBI 참조 서열 NP_000194.2에 의해 기재되는 야생형 인간 알파-L-이두로니다제의 아미노산 서열을 가진다. 그러나, 본 서열의 몇몇 천연 유래 기능성 다형성(변이체)이 기재되어 있고, 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다. 이러한 변이체는 기재되어 있으며; 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 WO 2014/151341뿐만 아니라, 예를 들어, 또한 참고로 포함되는 UniProtKB/Swiss-Prot; www.uniprot.org/uniprot/P35475을 참조한다.

[0077] 본 명세서에 이용되는 용어 "Nab 역가"는 표적화된 에피토프(예를 들어, AAV)의 생리학적 효과를 중화시키는 중화 항체(예를 들어, 항-AAV Nab)가 얼마나 많이 생성되는지의 측정이다. 항-AAV Nab 역가는, 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되는 Calcedo, R., et al., *Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses*. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390에 기재된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0078] 본 명세서에서 이용되는 "발현 카세트"는 IDUA 유전자, 프로모터를 포함하고, 이에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있는 핵산을 지칭하며, 이 카세트는 패키징 숙주 세포에 유전자 요소(예를 들어, 플라스미드)를 통해 전달되고 바이러스 벡터의 캡시드(예를 들어, 바이러스 입자) 내로 패키징될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성하기 위한 이러한 발현 카세트는 바이러스 게놈의 패키징 신호에 측정된 본 명세서에 기재된 IDUA 암호 서열 및 다른 발현 제어 서열, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 포함한다.

[0079] 약어 "sc"는 자기-상보성을 지칭한다. "자기-상보성 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해 운반되는 암호 영역이 분자내 이중-가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 감염 시, 제2 가닥의 세포 매개 합성에 대한 기다림보다는, scAAV의 2개의 상보성 절반들이 즉시 복제 및 전사의 준비가 되어 있는 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 형성하도록 회합될 것이다. 예를 들어, D M McCarty et al, "recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis" *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, 페이지 1248-1254 참조. 자기-상보성 AAV는, 예를 들어, 미국 특허 제 6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0080] 본 명세서에 이용되는 용어 "작동 가능하게 연결된"은 관심 대상의 유전자와 인접한 발현 제어 서열과 도중에 또는 관심 대상의 유전자를 제어하는 거리에서 작용하는 발현 제어 서열을 둘 다 지칭한다.

[0081] 용어 "이종성"은 단백질 또는 핵산에 대해 이용될 때 단백질 또는 핵산은 자연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 서열 또는 후속 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 새로운 기능성 핵산을 만들도록 배열된 관련없는 유전자로부터의 2개 이상의 서열을 갖는 핵산은 전형적으로 재조합적으로 생성된다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 핵산은 상이한 유전자로부터의 암호 서열의 발현을 지시하도록 배열된 하나의 유전자로부터의 프로모터를 가진다. 따라서, 암호 서열에 관해, 프로모터는 이종성이다.

[0082] "복제-결합 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"는 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하는데, 이때 관심 대상의 유전자를 포함하는 발현 카세트는 바이러스 캡시드 또는 외피에 패키징되며, 여기서 바이러스 캡시드 또는 외피 내에 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제-결합이고; 즉, 그들은 자손 비리온을 생성할 수 없지만, 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제에 필요한 효소를 암호화하는 유전자를 포함하지 않지만(게놈은 "무기력(gutless)"하게(인공 게놈의 증식 및 패키징에 필요한 신호에 측정하는 관심 대상의 이식유전자만을 포함) 되도록 조작될 수 있음), 이들 유전자는 생성 동안 공급될 수 있다.

따라서, 자손 비리온에 의한 복제 및 감염은 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재를 제외하고 일어날 수 없기 때문에 이는 유전자 요법에서 이용하기에 안전한 것으로 여겨진다.

[0083] 본 명세서에서 이용되는 "재조합 AAV9 바이러스 입자"는 AAV9 캡시드를 갖는 뉴클레아제-내성 입자(NRP)를 지칭하며, 캡시드는 그 안에 목적으로 하는 유전자 산물에 대한 발현 카세트를 포함하는 이중성 핵산 분자가 패키징된다. 이러한 발현 카세트는 전형적으로 유전자 서열에 측접하는 AAV 5' 및/또는 3' 반전 말단 반복부 서열을 포함하는데, 이때 유전자 서열은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 발현 카세트의 이들 및 다른 적합한 요소는 이하에 더 상세하게 기재되어 있으며, 대안적으로 본 명세서에서 이식유전자 게놈 서열로서 지칭될 수 있다. 이는 또한 "완전한" AAV 캡시드로서 지칭될 수 있다. 이러한 rAAV 바이러스 입자는 발현 카세트에 의해 운반되는 목적으로 하는 유전자 산물을 발현시킬 수 있는 숙주 세포에 이식유전자를 전달할 때 "약학적으로 활성"으로 칭해진다.

[0084] 다수의 예에서, rAAV 입자는 DNase 내성으로서 지칭된다. 그러나, 본 엔도뉴클레아제(DNase)에 추가로, 다른 엔도- 및 엑소- 뉴클레아제는 또한 오염 핵산을 제거하기 위해 본 명세서에 기재된 정제 단계에서 이용될 수 있다. 이러한 뉴클레아제는 단일 가닥 DNA 및/또는 이중-가닥 DNA 및 RNA를 분해하도록 선택될 수 있다. 이러한 단계는 단일 뉴클레아제 또는 상이한 표적과 관련된 뉴클레아제의 혼합물을 함유할 수 있고, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다.

[0085] 용어 "뉴클레아제-내성"은 AAV 캡시드가 이식유전자를 숙주 세포에 전달하도록 설계된 발현 카세트 주위에서 완전히 조립되었고 생성 과정으로부터 제공될 수 있는 오염 핵산을 제거하도록 설계된 뉴클레아제 인큐베이션 단계 동안 저하(분해)로부터 이들 패키징된 게놈 서열을 보호한다는 것을 나타낸다.

[0086] 본 명세서에서 이용되는 "AAV9 캡시드"는 본 명세서에 참고로 포함되는 젠뱅크 수탁 번호:AAS99264의 아미노산 서열을 갖는 AAV9를 지칭하며, AAV vp1 캡시드 단백질은 서열번호 7에서 복제된다. 이 암호화된 서열로부터의 일부 변형은 본 발명에 의해 포함되는데, 젠뱅크 수탁번호:AAS99264 및 미국 특허 제7906111호(또한 WO 2005/033321)에서 기준 아미노산 서열에 대해 약 99% 동일성(즉, 기준 서열로부터 약 1% 미만의 변형)을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 AAV는, 예를 들어, 천연 단리물(예를 들어, hu31 또는 hu32), 또는, 예를 들어, AAV9 캡시드와 함께 정렬된 임의의 다른 AAV 캡시드에서 대응하는 위치로부터 "동원된" 대안의 잔기로부터 선택된 아미노산 치환을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 갖는 AAV9의 변이체; 예를 들어, 예컨대 미국 특허 제9,102,949호, 미국 특허 제8,927,514호, 미국 특허 제2015/349911호; 및 WO 2016/049230A1에 기재된 것을 포함할 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, 상기 언급한 서열에 대해 적어도 약 95% 동일성을 갖는 AAV9 또는 AAV9 캡시드의 다른 변이체가 선택될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 제 2015/0079038호 참조. 캡시드, 그에 따른 암호 서열의 생성 방법 및 rAAV 바이러스 벡터의 생성 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 및 미국 특허 제2013/0045186A1호 참조.

[0087] 용어 "AAV9 중간체" 또는 "AAV9 벡터 중간체"는 그 안에 패키징된 목적으로 하는 게놈 서열이 없는 조립된 rAAV 캡시드를 지칭한다. 이들은 또한 "빈" 캡시드로서 칭해질 수 있다. 이러한 캡시드는 발현 카세트의 검출 가능한 게놈 서열을 포함하지 않거나, 또는 유전자 산물의 발현을 달성하기에 불충분한 단지 부분적으로 패키징된 게놈 서열만을 포함할 수 있다. 이들 빈 캡시드는 숙주 세포에 관심 대상의 유전자를 전달하도록 비-기능성이다.

[0088] 단수의 용어는 하나 이상을 지칭한다. 이렇게 해서 단수의 용어, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 이용된다.

[0089] 단어 "포함하다(comprise)", "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 배타적이기보다는 포괄적인 것으로 해석되어야 한다. 단어 "이루어지다", "이루어진" 및 그의 변형어는 포괄적이기보다는 배타적인 것으로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 다양한 실시형태가 "포함하는"이라는 언어를 이용하여 제시되지만, 다른 상황에서, 관련된 실시형태는 또한 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진"이라는 언어를 이용하여 해석되고 설명되는 것으로 의도된다.

[0090] 용어 "약"은 달리 구체화되지 않는 한, $\pm$ 10% 내의 그리고 이를 포함하는 변형을 포함한다.

[0091] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 이용되는 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되고, 당업자에게 본 출원에서 이용되는 다수의 용어에 대한 일반적 가이드를 제공하는 공개된 문헌을 참고하는 것과 동일한 의미를 가진다.

- [0092] 5.1. AAV.hIDUA 작제물 및 제형
- [0093] 5.1.1. 발현 카세트
- [0094] 특정 실시형태에서, 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 AAV 벡터가 제공된다. 본 발명자들에 의해 개발된 이 서열은 서열번호 2를 암호화하는 젠뱅크 NP000194.2의 공개된 유전자 암호 서열과 약 83% 동일성을 가진다. 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 서열번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 포함하며 기능성 인간 알파-L-이두로니다제를 암호화한다. 다른 실시형태에서, 상기 서열은 서열번호 1에 대해 적어도 약 85% 동일하거나 또는 서열번호 1에 대해 적어도 약 90% 동일하며 기능성 인간 알파-L-이두로니다제를 암호화한다. 일 실시형태에서, 상기 서열은 서열번호 1에 대해 적어도 약 95% 동일하거나, 서열번호 1에 대해 적어도 약 97% 동일하거나, 또는 서열번호 1에 대해 적어도 약 99% 동일하고, 기능성 인간 알파-L-이두로니다제를 암호화한다. 일 실시형태에서, 이는 인간 알파-L-이두로니다제의 리더 펩타이드 서열(즉, 서열번호 2의 약 아미노산 26 또는 약 아미노산 27 내지 약 아미노산 653을 암호화)을 포함하고, 서열번호 1의 약 1 내지 78에 대응하는 전장 hIDUA 유전자를 포함한다. 다른 실시형태에서, hIDUA 유전자는 기능성 알파-L-이두로니다제 효소의 분비 부분에 융합된 이중성 리더 서열을 포함하는 합성 펩타이드, 즉, 서열번호 2의 약 아미노산 27 내지 약 653 또는 본 명세서에서 동정되는 이의 기능성 변이체 중 하나를 포함하는 합성 펩타이드인 기능성 합성 인간 알파-L-이두로니다제 효소를 암호화한다. 또한 추가 발현 카세트는 서열번호 5 및 서열번호 6에서 동정되는 것을 포함한다. 각각에서, 발현 카세트는 AAV2 5' 및 3' ITR에 측접된다. 추가로, 각각은 프로모터, 인핸서, hIDUA 유전자, 및 폴리A를 포함한다.
- [0095] 다른 실시형태에서, 기능성 인간 알파-L-이두로니다제는 리더(신호) 펩타이드에 대응하는 서열번호 2의 처음 26개 아미노산의 모두 또는 일부가 이중성 리더 펩타이드로 대체되는 합성 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이 리더 펩타이드, 예를 들어, 예컨대 인터류킨-2(IL-2) 또는 온코스타틴으로부터의 리더 펩타이드는 그의 분비 경로를 통해 순환으로 세포 밖에서 효소의 수송을 개선시킬 수 있다. 적합한 리더 펩타이드는 반드시 아니더라도, 바람직하게는 인간 유래이다. 적합한 리더 펩타이드는 본 명세서에 참고로 포함되는 proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm로부터 선택될 수 있거나, 또는 선택된 단백질 내 리더(신호) 펩타이드를 결정하기 위한 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 제한하는 것은 아니지만, 이러한 서열은 길이가 약 15 내지 약 50개의 아미노산, 또는 길이가 약 19 내지 약 28개의 아미노산일 수 있거나, 또는 필요한 만큼 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 추가로, 적어도 하나의 시험관내 분석은 IDUA 효소의 효소 활성을 평가하는 데 유용한 것으로 기재되었다[예를 들어, Kakki *et al*, Mol Genet Metabol, 2001 Mar; 72(3): 199-208 참조].
- [0096] 서열에 대한 동일성 또는 유사성은 필요하다면 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후에 본 명세서에 제공된 펩타이드 및 폴리펩타이드 영역과 동일한(즉, 동일한 잔기) 또는 유사한(즉, 통상적인 측쇄 특성에 기반한 동일 그룹으로부터의 아미노산 잔기, 이하 참조) 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로서 본 명세서에서 나타낸다. 동일성 백분율(%)은 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 각각 비교함으로써 결정하는, 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩타이드 사이의 관계 측정이다. 일반적으로, 비교되는 두 서열은 서열 사이의 최대 상관관계를 제공하도록 정렬된다. 두 서열의 정렬이 시험되고, 두 서열 사이의 정확한 아미노산 또는 뉴클레오타이드 대응성을 제공하는 위치의 수가 결정되며, 정렬의 총 길이로 나눈 다음 100을 곱하여서 동일성% 수치를 제공한다. 이 동일성% 수치는 동일하거나 매우 유사한 길이를 갖고 고도로 상동성인 서열에 특히 적합한 비교될 전체 길이의 서열에 걸쳐 또는 동일하지 않은 길이를 갖거나 더 낮은 상동성 수준을 갖는 서열에 더 적합한 더 짧은 정해진 길이에 걸쳐 결정될 수 있다. 다수의 알고리즘 및 그에 기반한 컴퓨터 프로그램이 있으며, 이는 정렬 및 동일성 백분율을 수행하기 위해 문헌에서 이용되도록 이용 가능하고 및/또는 공공연하게 또는 상업적으로 이용 가능하다. 알고리즘 또는 프로그램의 선택은 본 발명을 제한하지 않는다.
- [0097] 적합한 정렬 프로그램의 예는, 예를 들어, 유닉스(Unix) 하에서, 그 다음에 바이오에디트(Bioedit) 프로그램 내로 들어오는 소프트웨어 CLUSTALW(Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98); 위스콘신 서열 분석 패키지, 버전 9.1(Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984, 미국 위스콘신주 메디슨에 소재한 제네틱 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)으로부터 입수 가능)을 포함한다. 프로그램 BESTFIT 및 GAP은 두 폴리뉴클레오타이드 사이의 동일성% 및 두 폴리펩타이드 서열 사이의 동일성%를 결정하기

위해 이용될 수 있다.

- [0098] 서열 사이의 동일성 및/또는 유사성을 결정하기 위한 다른 프로그램은, 예를 들어, 미국 메릴랜드주 베네스다에 소재한 미국 국립생물공학정보센터(NCB)로부터 입수 가능 하고 www.ncbi.nlm.nih.gov에서 NCBI의 홈페이지를 통해 접근 가능한 프로그램의 BLAST 패밀리인 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 부분인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 포함한다. 아미노산 서열을 비교하기 위한 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 가중치 잔기표, 갭 길이 페널티 12, 및 갭 페널티 4가 이용될 수 있으며; 그리고 FASTA(Pearson W. R. and Lipman D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988, 위스콘신 서열 분석 패키지의 부분으로서 이용 가능)가 이용될 수 있다. SeqWeb 소프트웨어(GCG 위스콘신 패키지에 대한 웹-기반 인터페이스: 갭 프로그램).
- [0099] 일부 실시형태에서, 카세트는 재조합 아데노-연관 바이러스로부터 발현되도록 설계되며, 벡터 계통은 또한 AAV 반전 말단 반복부(ITR)를 포함한다. 일 실시형태에서, rAAV는 위형이며(pseudotyped), 즉, AAV 캡시드는 ITR을 제공하는 AAV와 상이한 공급원 AAV로부터 유래된다. 일 실시형태에서, AAV 혈청형 2의 ITR이 이용된다. 그러나, 다른 적합한 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. 선택적으로, AAV는 자기-상보성 AAV일 수 있다.
- [0100] 본 명세서에 기재된 발현 카세트는 AAV 5' 반전 말단 반복부(ITR) 및 AAV 3' ITR을 이용하였다. 그러나, 이들 요소의 다른 배치가 적합할 수 있다. D-서열 및 최종 분해 부위(tr)가 결실되는, Δ ITR로 칭해지는, 5' ITR의 단축된 형태가 기재되었다. 다른 실시형태에서, 전장 AAV 5' 및/또는 3' ITR이 이용된다. 위형 AAV가 생성되는 경우, 발현 내 ITR은 캡시드의 AAV 공급원과 상이한 공급원으로부터 선택된다. 예를 들어, AAV2 ITR은 CNS 또는 조직 또는 CNS 내의 세포를 표적화하기 위해 특정 효율을 갖는 AAV 캡시드와 함께 이용하도록 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, AAV2로부터의 ITR 서열, 또는 이의 결실된 형태(Δ ITR)는 편리함을 위해 그리고 규제 승인을 가속화시키기 위해 이용된다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2로부터 유래되고 AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터 유래된 경우, 얻어진 벡터는 위형으로 칭해질 수 있다. 그러나, AAV ITR의 다른 공급원이 이용될 수 있다.
- [0101] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 뇌 수액 및 뇌를 포함하는 중추 신경계(CNS)에서의 발현 및 분비를 위해 설계된다. 특히 바람직한 실시형태에서, 발현 카세트는 CNS와 간 둘 다에서의 발현에 유용하고, MPSI, 혈터, 혈터-샤이에 및 샤이에 증후군의 전신 효과와 CNS-관련 효과의 치료를 허용한다. 예를 들어, 본 발명자들은 특정 구성적 프로모터(예를 들어, CMV)가 척추강내로 전달될 때 목적으로 하는 수준에서 발현을 유도하지 않음으로써, 차선의 hIDUA 발현 수준을 제공한다는 것을 관찰하였다. 그러나, 닭 베타-액틴 프로모터는 척추강내 전달과 전신 전달 시 발현을 잘 유도한다. 따라서, 이는 특히 바람직한 프로모터이다. 다른 프로모터가 선택될 수 있지만, 이를 포함하는 발현 카세트는 닭 베타-액틴 프로모터를 갖는 것의 모든 이점을 갖지 않을 수도 있다. 다양한 닭 베타-액틴 프로모터는 단독으로 또는 다양한 인핸서 요소(예를 들어, CB7은 닭 베타 액틴의 프로모터, 제1 엑손 및 제1 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용자를 포함하는 거대세포바이러스 인핸서 요소인 CAG 프로모터를 갖는 닭 베타-액틴 프로모터임), CBh 프로모터와 조합하여 기재되었다[SJ Gray et al, Hu Gene Ther, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153].
- [0102] 조직-특이적인 프로모터의 예는 특히 간 및 다른 조직(알부민, Miyatake et al., (1997) *J. Virol.*, **71**:5124-32); B형 간염 바이러스 코어 프로모터, Sandig et al., (1996) *Gene Ther.*, **3**:1002-9; 알파-태아단백질(AFP), Arbutnot et al., (1996) *Hum. Gene Ther.*, **7**:1503-14), 뼈 오스테오칼신(Stein et al., (1997) *Mol. Biol. Rep.*, **24**:185-96); 뼈 시알로단백질(Chen et al., (1996) *J. Bone Miner. Res.*, **11**:654-64), 림프구(CD2, Hansal et al., (1998) *J. Immunol.*, **161**:1063-8; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체쇄), 뉴런원, 예컨대 뉴런-특이적 엔올라제(NSE) 프로모터(Andersen et al., (1993) *Cell. Mol. Neurobiol.*, **13**:503-15), 신경필라멘트 경쇄 유전자(Piccioli et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**:5611-5), 및 뉴런-특이적 vgf 유전자(Piccioli et al., (1995) *Neuron*, **15**:373-84)에 대해 잘 알려져 있다. 대안적으로, 조절 가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되는 WO 2011/126808B2 참조.
- [0103] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 하나 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 2 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 이들 인핸서는 동일할 수도 있고 상이할 수도 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서 또는 CMV 인핸서를 포함할 수 있다. 이 인핸서는 서로 인접해서 위치되는 2개의 복제물에 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 복제물은 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 추가로 인트론, 예를 들어, 닭 베타-액틴 인트론, 인간 β -글로불린 인트론, 및/또는 상업적으로 입수 가능한 프로메가(Promega)(등록상표) 인트론을 추가로 포함한다. 다른 적합한 인트론은 당업계에 공지된 것, 예를 들어, WO 2011/126808에 기재된 것을 포함한다.

- [0104] 추가로, 본 발명의 발현 카세트는 적합한 폴리아데닐화 신호를 구비한다. 일 실시형태에서, 폴리아데닐화 신호는 토끼 글로불린 폴리아데닐화 신호이다. 예를 들어, WO 2014/151341 참조. 대안적으로, 다른 폴리아데닐화 신호, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 신호, SV50 폴리아데닐화 신호, 또는 합성 폴리아데닐화 신호, 또는 통상적인 조절 요소가 추가로 또는 선택적으로 발현 카세트에 포함될 수 있다.
- [0105] 5.1.2. rAAV.hIDUA 바이러스 입자의 생성
- [0106] 특정 실시형태에서, AAV 캡시드를 갖고 그 안에 이의 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하에 AAV 반전 말단 반복부, 인간 알파-L-이두로니다제(hIDUA) 유전자가 패키징된 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자가 제공되되, 기능성 인간 알파-L-이두로니다제를 암호화하는 상기 hIDUA 유전자는 서열번호 1 또는 그에 대해 적어도 약 95% 동일한 서열을 나타낸 서열을 가진다. 또한 도 1의 개략도 참조. 일 실시형태에서, hIDUA 발현 카세트는 AAV5' ITR 및 AAV3' ITR에 축적된다. 다른 실시형태에서, AAV는 단일 가닥 AAV일 수 있다.
- [0107] 척추강내 전달에 대해, AAV9가 특히 바람직하다. AAV9의 서열 및 AAV9 캡시드에 기반한 벡터를 생성하는 방법은 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제7,906,111호; 미국 특허 제2015/0315612호; WO 2012/112832에 기재되어 있다. 선택적으로, 본 명세서에 기재된 rAAV9.hIDUA 벡터는 간을 특이적으로 표적화하도록 설계된 벡터와 함께 공동투여될 수 있다. 간 친화성을 갖는 임의의 다수의 rAAV 벡터가 이용될 수 있다. rAAV의 캡시드에 대한 공급원으로서 선택될 수 있는 AAV의 예는, 예를 들어, rh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8을 포함한다[예를 들어, 미국 특허 공개 제2007-0036760-A1호; 미국 특허 공개 제2009-0197338-A1호; 유럽 특허 제1310571호 참조]. 또한 WO 2003/042397(AAV7 및 기타 시미안 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), WO 2005/033321 및 미국 특허 제7,906,111호(AAV9), 및 WO 2006/110689], 및 rh10 [WO 2003/042397], AAV3B; AAVdj [US 2010/0047174] 참조. 하나의 특허 바람직한 rAAV는 AAV2/8.TBG.hIDUA.co이다.
- [0108] 다수의 예에서, rAAV 입자는 DNase 내성으로서 지칭된다. 그러나, 본 엔도뉴클레아제(DNase)에 추가로, 다른 엔도- 및 엑소- 뉴클레아제는 또한 오염 핵산을 제거하기 위해 본 명세서에 기재된 정제 단계에서 이용될 수 있다. 이러한 뉴클레아제는 단일 가닥 DNA 및/또는 이중-가닥 DNA 및 RNA를 분해하도록 선택될 수 있다. 이러한 단계는 단일 뉴클레아제 또는 상이한 표적과 관련된 뉴클레아제의 혼합물을 함유할 수 있고, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다.
- [0109] AAV-기반 벡터를 제조하는 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2007/0036760호(2007년 2월 15일) 참조. AAV9의 AAV 캡시드의 이용은 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 특히 적합하다. 추가적으로, AAV8의 서열 및 AAV8 캡시드에 기반하여 벡터를 생성하는 방법은 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호 및 미국 특허 제8,318,480호에 기재되어 있다. 그러나, 다른 AAV 캡시드가 본 발명에서 이용을 위해 선택되거나 또는 생성될 수 있다. 다수의 이러한 AAV의 서열은 상기 열거한 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호, 미국 특허 제8,318,480호 및 미국 특허 제7,906,111호에서 제공되고 및/또는 제본으로부터 입수 가능하다. 임의의 AAV 캡시드의 서열은 합성으로 또는 다양한 분자 생물학 및 유전자 조작 기법을 이용하여 용이하게 생성될 수 있다. 적합한 생성 기법은 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예를 들어, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY) 참조. 대안적으로, 올리고뉴클레오타이드 암호화 펩타이드(예를 들어, CDR) 또는 펩타이드 그 자체는 합성으로, 예를 들어, 잘 공지된 고체상 펩타이드 합성 방법에 의해 생성될 수 있다(Merrifield, (1962) J. Am. Chem. Soc., **85**:2149; Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62). 이들 및 다른 적합한 생성 방법은 당업자의 지식 내이며, 본 발명의 제한이 아니다.
- [0110] 본 명세서에 기재된 재조합 아데노 연관 바이러스(AAV)는 공지된 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; 미국 특허 제7588772 B2호 참조. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 암호화하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소로, AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 이식유전자로 구성된 발현 카세트; 및 AAV 캡시드 단백질 내로 발현 카세트의 패키징을 허용하는 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양시키는 단계를 수반한다.
- [0111] 비어 있는 그리고 차 있는 입자 함량을 계산하기 위해, 선택 샘플(예를 들어, 본 명세서의 실시예에서 아이오딘산을 구배-정제 제제, 여기서 GC의 수= 입자의 수)에 대한 VP3 밴드 용적은 부하된 GC 입자에 대해 플롯팅된다. 얻어진 선형 식($y = mx+c$)은 시험 항목 피크의 밴드 용적에서 입자의 수를 계산하기 위해 이용된다. 이어서 부하된 20 μ L 당 입자(pt)의 수에 50을 곱하여서 입자(pt)/mL를 제공한다. Pt/mL를 GC/mL로 나누어서 계승 복제물에 대한 입자의 비율(pt/GC)을 제공한다. Pt/mL-GC/mL는 비어있는 pt/mL를 제공한다. 비어 있는 pt/mL를 pt/mL

로 나누고 100을 곱하여서 비어 있는 입자의 백분율을 제공한다.

[0112] 일반적으로, 패키징된 게놈을 이용하여 비어 있는 캡시드 및 AAV 벡터 입자를 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128 참조. 변성 캡시드를 시험하기 위해, 상기 방법은 처리된 AAV 저장액에 3가지 캡시드 단백질, 예를 들어, 완충제 중에 3 내지 8% 트리스-아세트이트를 구매 겔을 분리시킬 수 있는 임의의 겔로 이루어진 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 실시하는 단계, 이어서, 샘플 물질이 분리될 때까지 겔을 진행시키는 단계, 이어서, 겔을 나일론 또는 나이트로셀룰로스막, 바람직하게는 나일론 상에 블롯팅하는 단계를 포함한다. 이어서, 항-AAV 캡시드 항체는 변성된 캡시드 단백질, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론성 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론성 항체에 결합하는 1차 항체로서 이용된다(Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). 이어서, 2차 항체, 즉, 1차 항체에 결합하고 1차 항체에 의한 결합을 검출하기 위한 수단을 포함하는 것, 더 바람직하게는 공유결합되는 검출 분자를 포함하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 겨자무과산화효소에 공유 결합된 양 항-마우스 IgG 항체가 이용된다. 결합을 검출하기 위한 방법, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출을 검출할 수 있는 검출 방법, 전자기 복사 또는 표색 변화, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트는 1차 항체와 2차 항체 사이의 결합을 반-정량적으로 결정하기 위해 이용된다. 예를 들어, SDS-PAGE에 대해, 칼럼 분획으로부터의 샘플을 취하고 환원제(예를 들어, DTT)를 함유하는 SDS-PAGE 장입 완충제에서 가열될 수 있으며, 캡시드 단백질은 구조적 구매 폴리아크릴아마이드 겔(예를 들어, 노벡스(Novex)) 상에서 분해되었다. 제조업자의 설명서에 따라 실버엑스프레스(SilverXpress)(캘리포니아주 인비트로젠(Invitrogen))를 이용하는 은 염색 또는 다른 적합한 염색 방법, 즉, 사이프로(SYPRO) 루비 또는 쿠마씨 염색이 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 칼럼 분획 중의 AAV 벡터 게놈(vg) 농도는 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해 측정될 수 있다. 외인성 DNA를 제거하기 위해 샘플은 DNase I(또는 다른 적합한 뉴클레아제)를 이용하여 희석되고 분해된다. 뉴클레아제의 비활성화 후에, 상기 샘플은 추가로 희석되며, 프라이머 및 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 택맨(TaqMan)(상표명) 형광원 프로브를 이용하여 증폭시킨다. 정해진 형광 수준에 도달하는 데 필요한 주기(역치 주기, Ct)의 수를 어플라이드 바이오시스템즈 프라임 7700(Applied Biosystems Prism 7700) 서열 검출 시스템 상에서 각각의 샘플에 대해 측정한다. AAV 벡터에 포함된 것에 대해 동일한 서열을 포함하는 플라스미드 DNA는 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성하는 데 이용된다. 샘플로부터 얻은 주기 역치(Ct) 값을 이용하여 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값에 그것을 정규화시킴으로써 벡터 게놈 역가를 결정한다. 디지털 PCR에 기반한 종말점 분석을 또한 이용할 수 있다.

[0113] 일 양상에서, 광범위 세린 프로테아제, 예를 들어, 프로테이나제 K(예컨대 퀴아젠(Qiagen)으로부터 상업적으로 입수 가능)을 이용하는 최적화된 q-PCR 방법이 이용된다. 더 구체적으로는, 최적화된 qPCR 게놈 역가 분석은 DNase I 분해 후에, 샘플이 프로테이나제 K 완충제에 의해 희석되고 프로테이나제 K로 처리된 후에 열 비활성화된다는 것을 제외하고 표준 분석과 유사하다. 적합하게는 샘플은 샘플 크기와 동일한 양으로 프로테이나제 K 완충제에 의해 희석된다. 프로테이나제 K 완충제는 2배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2mg/mL이지만, 0.1mg/mL 내지 약 1mg/mL로 다를 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55°C에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 저온(예를 들어, 약 37°C 내지 약 50°C)에서 더 긴 시간 기간(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분)에 걸쳐, 또는 더 고온(예를 들어, 약 60°C까지)에서 더 짧은 시간 기간(예를 들어, 약 5 내지 10분) 동안 수행될 수 있다. 유사하게는, 열 비활성화는 일반적으로 약 95°C에서 약 15분 동안이지만, 온도는 더 낮아질 수 있고(예를 들어, 약 70 내지 약 90°C) 시간은 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 이어서, 샘플은 희석되고(예를 들어, 1000배) 표준 분석에서 기재하는 바와 같이 택맨 분석이 실시된다.

[0114] 추가적으로, 또는 대안적으로, 점적 디지털 PCR(ddPCR)이 이용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의해 단일-가닥 및 자기-상보성 AAV 벡터 게놈 역가를 결정하기 위한 방법이 기재되었다. 예를 들어, M. Lock et al, *Hu Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14 참조.

[0115] 간략하게, 게놈-결여 AAV9 중간체로부터의 패키징된 게놈 서열을 갖는 rAAV9 입자를 분리하기 위한 방법은 재조합 AAV9 바이러스 입자 및 AAV 9 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액에 빠른 성능 액체 크로마토그래피를 실시하는 단계를 수반하되, AAV9 바이러스 입자 및 AAV9 중간체는 pH 10.2에서 평형상태로 된 강한 음이온 교환 수지에 결합되고, 약 260 내지 약 280의 자외선 흡광도에 대한 용출액을 모니터링하는 동안 염 구배를 실시하였다. rAAV9에 대해 더 적게 최적이지만, pH는 약 10.0 내지 10.4의 범위일 수 있다. 이 방법에서, A260/A280의 비율이 굴절 지점에 도달할 때 AAV9 전체 캡시드는 용리되는 분획으로부터 수집된다. 일 예에서, 친화도 크로마토그래피 단계에 대해, 정용여과 산물은 AAV2/9 혈청형을 효율적으로 포획하는 캡처 셀렉트(Capture

Select)(상표명) 포로스- AAV2/9 친화도 수지(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 적용된다. 이들 이온성 조건 하에서, 잔여 세포 DNA 및 단백질의 상당한 백분율은 칼럼을 통해 유동하는 한편, AAV 입자는 효율적으로 포획된다.

[0116] rAAV.hIDUA 벡터는 이하의 부문 5.4 및 실시예 5에서 더 상세하게 기재되는, 도 11에서 나타내는 흐름도에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다.

[0117] 5.1.3. rAAV.hIDUA의 약제학적 제형

[0118] rAAV9.hIDUA 제형은 식염수, 계면활성제, 및 생리적으로 적합한 염 또는 염의 혼합물을 함유하는 수용액 중에 현탁된 유효량의 AAV.hIDUA 벡터를 함유하는 현탁액이다. 적합하게는, 제형은 생리적으로 허용 가능한 pH, 예를 들어, pH 6 내지 8, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8 범위에서 조절된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32이기 때문에, 척추강내 전달을 위해서는, 이 범위 내의 pH가 바람직한 반면에; 정맥내 전달을 위해서는, 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이들 하위 범위 내의 다른 pH는 다른 전달 경로에 대해 선택될 수 있다.

[0119] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합물은 비독성인 비이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 1차 하이드록실기에서 중결되는 2작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 폴록사머(폴록사머) 188로서도 알려져 있고 중성 pH를 갖고 평균 분자량이 8400인 플루로닉(Pluronic)(등록상표) F68[BASF]이 선택된다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇠에 축적되는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇠, 솔루톨(SOLUTOL) HS 15(마크로글-15 하이드록시스테아레이트), 라브라솔(LABRASOL)(폴리옥시 카프릴 글리세라이드), 폴리옥시 10 올레일 에터, 트윈(TWEEN)(폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌글리콜로 구성되는 비이온성 삼블록 공중합체가 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 통상적으로 글자 "P"(폴록사머에 대해) 다음에 3개의 숫자로 명명되며: 처음 2개의 숫자 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략의 분자량을 제공하고, 마지막 숫자 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다.

[0120] 일 실시형태에서, 제형은, 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되는 M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14에 기재된 바와 같이 qPCR 또는 디지털 점적 PCR(ddPCR)에 의해 측정하여, 예를 들어, 적어도 약 1×10^9 개의 GC/mL 내지 3×10^{13} 개의 GC/mL의 농도를 함유할 수 있다.

[0121] 일 실시형태에서, 냉동 형태로 본 명세서에 기재된 바와 같은 완충제 용액 중에 rAAV를 함유하는 냉동 조성물이 제공된다. 선택적으로, 1종 이상의 계면활성제(예를 들어, 플루로닉 F68), 안정제 또는 보존제가 본 조성물 중에 존재한다. 적합하게는, 이용을 위해, 조성물은 해동되고, 적합한 희석제, 예를 들어, 멸균 식염수 또는 완충 식염수를 이용하여 목적으로 하는 용량으로 적정된다.

[0122] 일 예에서, 제형은, 예를 들어, 수 중에서 염화나트륨, 중탄산나트륨, 텍스트로스, 황산마그네슘(예를 들어, 황산마그네슘 · 7H₂O), 염화마그네슘 염화칼륨, 염화칼슘(예를 들어, 염화칼슘 · 2H₂O), 인산나트륨(예를 들어, 2염기성 인산나트륨), 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함하는 완충 식염수 용액을 함유할 수 있다. 제형은 또한 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 예를 들어, 텍스트로스 및/또는 폴록사머를 함유할 수 있다. 적합하게는, 척추강내 전달을 위해, 삼투압은 뇌척수액에 적합한 범위(예를 들어, 약 275 내지 약 290) 내이다; 예를 들어, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview 참조. 선택적으로, 척추강내 전달을 위해, 상업적으로 입수 가능한 희석제는 현탁제로서, 또는 다른 현탁제 및 다른 선택적 부형제와 조합하여 이용될 수 있다. 예를 들어, 엘리엇 B(Elliotts B)(등록상표) 용액[루카르 메디칼(Lukare Medical)] 참조.

[0123] 다른 실시형태에서, 제형은 1종 이상의 침투 향상제를 함유할 수 있다. 적합한 침투 향상제의 예는, 예를 들어, 만니톨, 글리콜산나트륨, 타우로콜산나트륨, 데옥시콜산나트륨, 살리실산나트륨, 카프릴산나트륨, 카프르산나트륨, 라우릴황산나트륨, 폴리옥시에틸렌-9-라우렐 에터, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.

[0124] 특정 실시형태에서, 제형(선택적으로 냉동됨), 선택적 희석 완충제 중에서 현탁된 농축된 벡터를 포함하는 키트가 제공되며, 척추강내 투여에 필요한 장치 및 다른 부품이 제공된다. 다른 실시형태에서, 키트는 추가로 또는 대안적으로 정맥내 전달을 위한 부품을 포함한다. 일 실시형태에서, 키트는 주사를 허용하는 충분한 완충제를 제공한다. 이러한 완충제는 농축된 벡터의 약 1:1 내지 1:5 희석 또는 그 이상을 허용할 수 있다. 다른 실시형

태에서, 치료 임상상에 의해 용량 적정 및 다른 조절을 허용하기 위해 더 고량의 또는 더 저량의 완충제 또는 멸균수가 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 장치의 하나 이상의 부품이 키트에 포함된다.

[0125] 특정 실시형태에서, 희석은 임상 약제학적으로 층류 공기 흐름 캐비닛에서 다음과 같이 무균 기법을 이용하여 수행될 수 있다. 주사기 및 니들이 없는 바이알 어댑터를 이용하여 AAV9.hIDUA를 함유하는 미리 정해진 용적의 현탁액(이전에 냉동되었을 수도 있음)을 빼낸 후 이어서, 플라스틱 니들 덮개로 덮여있는 멸균 스테인레스강 봉투에 니들을 주사기를 막는다. 주사기 및 니들이 없는 바이알 어댑터를 이용하여 미리 결정된 용적의 희석액을 빼낸 후 이어서, 플라스틱 니들 덮개로 덮여있는 멸균 스테인레스강 봉투에 니들을 주사기를 막는다. 주사기 외부의 멸균성이 유지된다는 것을 보장하기 위해 멸균 기법을 이용하여 희석액에 이어서, AAV9.hIDUA를 함유하는 현탁액을 제3 "투약" 주사기로 전달한다. 팁 캡을 이용하여 주사기를 막고 반전을 통해 혼합한다. 캡을 제거하고 목적으로 하는 전달 용적을 준비하고 막고 라벨링한 다음 6시간 이내에 이용을 위해 수술실로 운반할 수 있는 멸균 팩에 패키징한다.

[0126] 5.2. 유전자 요법 프로토콜

[0127] 5.2.1 표적 환자 집단

[0128] 본 명세서에 기재된 치료적 유효량의 변형된 hIDUA 발현 카세트를 전달하는 단계를 포함하는 I형 점액 다당류증을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 특히, 신경 인지적 쇠퇴의 예방, 치료 및/또는 개선이 필요한 환자에게 본 명세서에 기재된 치료적 유효량의 rAAV.hIDUA를 전달하는 단계를 포함하는, MPSI로 진단된 환자에서 신경 인지적 쇠퇴를 예방, 치료 및/또는 개선시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 "치료적 유효량"의 rAAV.hIDUA 벡터는 다음의 단락 중 임의의 하나에서 동정된 증상 중 하나 이상을 고칠 수 있다.

[0129] 치료를 위한 후보인 환자는 MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에와 관련된 증상을 갖는 소아 및 성인 환자이다. MPSI 장애는 초기 중증(혈러)으로부터 이후의 개시(샤이에) 형태의 질환 범위이다. 혈러 증후군은 전형적으로 IDUA 효소 활성이 없는 것(0%)을 특징으로 하며 초기에 진단되고, 발달 지연, 간비종대, 골 연루, 각막 혼탁, 관절 연루, 귀먹음, 심장 연루 및 수명의 처음 10년 동안 사망을 특징으로 한다. 혈러-샤이에 환자는 일부 IDUA 효소 활성(0% 초과이지만 전형적으로 2% 미만임)을 갖고 가변적인 지식 효과, 호흡 질환, 폐쇄성 기도 질환, 심혈관 질환, 관절 강직/구축, 골격 기형, 시력 감소 및 10대 또는 20대에 사망이 있는 것으로 관찰되었다. 샤이에 증후군을 갖는 환자는 전형적으로 "정상" IDUA 효소 활성의 적어도 2%를 가지며, 이후에 진단되고; 이러한 환자는 전형적으로 정상 지능을 갖지만, 간비종대, 관절 연루, 신경 포획, 귀먹음, 심장 연루 및 정상 수명을 가진다. 또한, Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type 1 (MPS I): A Systematic Review of Evidence Report of Final Findings, Final Version 1.1, Prepared for: MATERNAL AND CHILD HEALTH BUREAU 참조. www.hrsa.gov/advisorycommittees/mchbadvisory/heritabledisorders/nominatecondition/reviews/mps1finalreport.pdf.

[0130] 본 발명의 조성물은 경증 내지 완전한 아나필락시스뿐만 아니라 평생 동안의 말초 접근, 예컨대 국소 및 전신 감염의 합병증의 범위일 수 있는 재조합 효소에 대한 면역 반응과 관련된 장기간 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy: ERT)의 합병증을 피한다. ERT와 대조적으로, 본 발명의 조성물은 일생 동안의 반복된 매 주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 본 명세서에 기재된 치료 방법은, CNS 구획 밖으로 치료 영향력을 제공하는, 지속적인, 상승된 순환 IDUA 수준을 제공하는 높은 형질도입 효율을 갖는 벡터에 의해 영향받는 효율적인, 장기간 유전자 전달을 제공함으로써 MPSI 장애와 관련된 적어도 중추 신경계를 고치는 데 유용한 것으로 여겨진다. 추가로, CNS 내로 AAV-매개 전달 전에 단백질 형태로 또는 rAAV-hIDUA 형태로 효소의 직접적인 전신 전달을 포함하는 다양한 경로에 의해 활성 관용을 제공하고 효소에 대한 항체 형성을 방지하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0131] 일부 실시형태에서, 혈러 증후군으로 진단된 환자는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 혈러-샤이에 증후군으로 진단된 환자는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 샤이에 증후군으로 진단된 환자는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 신경인지 결함이 있는 MPS I을 갖는 소아 대상체는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다.

[0132] 특정 실시형태에서, 신생아(3개월 이하) 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 특정 실시형태에서, 3개월령 내지 9개월령인 아기는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 특정 실시형태에서, 9개월령 내지 36개월령인 어린이는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 특정 실시형태에서, 3세 내지 12세인 어린이는 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 특정 실시형태에서, 12세 내지 18세인 어린이는 본 명세서에 기재된 방법

에 따라 치료된다. 특정 실시형태에서, 18세 이상인 성인은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다.

- [0133] 일 실시형태에서, 환자는 혈리 증후군을 가질 수 있고 적어도 약 3개월 내지 12개월령의 남성 또는 여성이다. 다른 실시형태에서, 환자는 MPSI 병태를 가질 수 있고 약 49개월(4세 초과) 내지 약 72개월(6세)일 수 있다. 다른 실시형태에서, 환자는 남성 또는 여성 혈리-샤이에 환자일 수 있고, 적어도 약 6세 내지 18세이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 더 나이가 있거나 또는 더 어릴 수 있고, 남성 또는 여성일 수 있다.
- [0134] 적합하게는, 치료를 위해 선택된 환자는 다음의 특징 중 하나 이상을 갖는 것을 포함할 수 있다: 혈장, 섬유아 세포 또는 백혈구에서 측정되는 IDUA 효소 활성의 결여 또는 감소에 의해 확인되는 MPS I의 기록된 진단; 임의의 다른 신경학적 또는 정신 의학적 인자에 의해 설명할 수 없다면 다음 중 하나로서 나타내는 MPS I에 기인하는 초기 신경인지 결함의 기록된 증거: - IQ 검사 상에서 또는 신경정신학적 기능의 1 영역(언어, 기억, 주의력 또는 비언어 능력)에서 평균 미만의 표준 편차 스코어 1, 또는 - 순차적 검사 상에서 표준 편차 1 초과의 쇠퇴의 기록된 이력 증거. 대안적으로, 소변 또는 유전자 검사에서 증가된 GAG가 이용될 수 있다.
- [0135] 치료 전에, 대상체, 예를 들어, 영아는 바람직하게는 MPS I 환자, 즉, hIDUA를 암호화하는 유전자에서 돌연변이를 갖는 환자를 동정하기 위해 유전형질분석을 겪는다. 특정 집단에서, 대상체는 나이가 더 있을 수도 있으며, 예를 들어, 3세 미만 내지 72개월(6세), 또는 그 이상일 수도 있다. 치료 전에, MPS I 환자는 hIDUA 유전자를 전달하기 위해 이용되는 AAV 혈청형에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 5 이하의 AAV에 대한 중화 항체 역가를 갖는 MPS I 환자는 본 명세서에 기재된 방법 중 임의의 하나 이상에 따라 치료된다.
- [0136] 치료 전에, MPSI 환자는 hIDUA 유전자를 전달하기 위해 이용되는 AAV 벡터의 캡시드에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 이러한 Nab는 형질도입은 형질도입 효율을 방해하고 치료 효능을 감소시킬 수 있다. 기준 혈청 Nab 역가 $\leq 1:5$ 인 MPS I 환자는 rAAV.hIDUA 유전자 요법 프로토콜을 이용하는 치료를 위한 양호한 후보이다. 혈청 Nab $>1:5$ 의 역가를 갖는 MPS I 환자의 치료는 조합 요법, 예컨대 rAAV.hIDUA 벡터 전달을 이용한 치료 전에 및/또는 동안에 면역 억제제와 함께 일시적 공동 치료를 필요로 할 수 있다. 선택적으로, 면역 억제성 공동 요법은 AAV 벡터 캡시드 및/또는 제형의 다른 성분에 대한 중화 항체의 선행 평가 없이 예방 측정으로서 이용될 수 있다. 선행 면역 억제 요법은 특히 사실상 IDUA 활성 수준이 없는 환자에서 hIDUA 이식유전자 산물에 대한 잠재적 유해 면역 반응을 방지하는데 바람직할 수 있으며, 여기서 이식유전자 산물은 "외래"로서 보일 수 있다. 이하에 기재된 마우스, 개 및 NHP에서 비임상 연구의 결과는 hIDUA 및 신경염증에 대한 면역 반응의 발생과 일치된다. 인간 대상체에서 유사한 반응이 일어나지 않을 수도 있지만, 예방책으로서 면역 억제 요법이 rAAV-hIDUA의 모든 수용자에 대해 권장된다.
- [0137] 이러한 공동 요법에 대한 면역 억제제는 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마크로라이드, 및 알킬화제, 대사길항물질, 세포독성 항생제, 항체 또는 이뮤노필린에 대해 활성인 제제를 포함하는 세포정지제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 선택되는 하나 이상의 마이크로라이드는 면역 억제제이다. 특정 실시형태에서, 마이크로라이드는 비-항생 면역 억제제이다. 이들 비-항생 면역 억제제는 상이한 작용 메커니즘을 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 칼시뉴린 저해제(예를 들어, 타크롤리무스), mTOR 저해제(예를 들어, 시롤리무스, 템시롤리무스, 에버롤리무스, 또는 다른 라파로그), 또는 이들의 조합. 다른 적합한 비-항생 면역 억제제는 피메크롤리무스일 수 있다.
- [0138] 면역 억제제는 질소 머스터드, 니트로소유레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 마이코페놀레이트 모페틸, 메토트렉세이트, 레플루노마이드(아라바(Arava)), 사이클로포스파마이드, 클로람부실(류케란(Leukeran)), 클로로퀸(예를 들어, 하이드록시클로로퀸), 황산퀴닌, 메플로퀸, 아토바쿠온과 프로구아닐의 조합, 설파살라진, 머캅토프린, 플루오로유라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-관련 항체, 항-IL-2 항체, 아바타셉트(오렌시아(Orencia)), 아달리무맙(휴미라(Humira)), 아나킨라(키너렛(Kineret)), 세르톨리주맙(심지아(Cimzia)), 에타너셉트(엔브렐(Enbrel)), 골리무맙(심포니(Simponi)), 인플릭시맙(레미케이드(Remicade)), 리툭시맙(리툭산(Rituxan)), 토실리주맙(악템라(Actemra)) 및 토파시티닙(젤잔즈(Xeljanz)), 사이클로스포린, 타크롤리무스, mTOR 저해제(예를 들어, 시롤리무스(즉, 라파마이신), 템시롤리무스, 또는 라파로그), IFN- β , IFN- γ , 오피오이드 또는 TNF- α (종양 괴사 인자-알파) 결합제, 및 이들 약물의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 억제성 요법은 유전자 요법 투여 전에 0, 1, 2, 7일 이상에 시작될 수 있다. 이러한 요법은 동일한 날에 2종 이상의 약물의 공동 투여를 수반한다. 일 실시형태에서, 2종 이상의 약물은, 예를 들어, 1종 이상의 코르티코스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론 또는 프레드니손) 및 선택적으로, MMF, 및/또는 칼시뉴린 저해제(예를 들어, 타크롤리무

스), 및/또는 mTOR 저해제(템시롤리무스 또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))일 수 있다. 일 실시형태에서, 2종 이상의 약물은 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 시롤리무스이다. 다른 실시형태에서, 2종 이상의 약물은, 예를 들어, 메틸프레드니솔론, 프레드니손, 타크롤리무스, 및/또는 시롤리무스일 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 억제 요법은 코르티코스테로이드, 타크롤리무스 및 시롤리무스로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 약물은 벡터 전달 전 0 내지 15일 동안 MMF 및 타크롤리무스이고 8주 동안 MMF로 및/또는 타크롤리무스를 이용하는 후속 지정 전반에 걸쳐 유지한다. 이들 약물 중 1종 이상은 동일한 용량 또는 조절된 용량으로 유전자 요법 투여 후에 계속될 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 용량이 부하되도록 처음에 IV 스테로이드(예를 들어, 메틸프레드니솔론)에 이어서, 제12 주까지 환자에게 스테로이드가 없도록 점점 줄어드는 경구로 스테로이드(예를 들어, 프레드니솔론)가 투약된다. 코르티코스테로이드 치료는 타크롤리무스(24주 동안) 및/또는 시롤리무스(12주 동안)에 의해 보충되며, MMF로 더 보충될 수 있다. 타크롤리무스 및 시롤리무스 둘 다를 이용할 때, 각각의 용량은 약 4 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 또는 총 약 8 ng/mL 내지 약 16 ng/mL의 혈액 트로프 수준을 유지하도록 조절된 작은 용량이어야 한다. 특정 실시형태에서, 이들 제제 중에서 단 1종만이 사용될 때, 타크롤리무스 및/또는 시롤리무스에 대한 총 용량은 약 16 ng/mL 내지 약 24 ng/mL의 범위일 수도 있다. 이들 제제 중에서 단 1종만이 사용될 때, 라벨 용량(더 높은 용량)이 이용되어야 한다; 예를 들어, 12시간마다 둘로 나누어진 용량으로 제공되는 0.15-0.20 mg/kg/day의 타크롤리무스; 및 1 mg/m²/day의 시롤리무스; 장입 용량은 3 mg/m²여야 한다. MMF가 요법에 첨가되면, 타크롤리무스 및/또는 시롤리무스에 대한 용량은 작용 메커니즘이 상이하기 때문에 유지될 수 있다. 이들 및 다른 요법은 약 -제14 일 내지 -제1 일(예를 들어, -제2 일, 제0 일, 등)에 시작되고, 필요하다면 최대 약 1주일(7일), 또는 최대 약 60일, 또는 최대 약 12주, 또는 최대 약 16주, 또는 최대 약 24주, 또는 최대 약 48주, 또는 그 이상 지속된다. 특정 실시형태에서, 무 타크롤리무스 요법이 선택된다.

- [0139] 그럼에도, 일 실시형태에서, 다음의 특징 중 하나 이상을 갖는 환자는 그들의 담당 의사의 판단으로 치료로부터 제외될 수 있다:
- [0140] · 다음 중 임의의 것을 포함하는 IC 주사에 대한 금기를 가짐:
- [0141] ° 기준 MRI 검사의 검토는 IC 주사에 대한 금기를 나타냄.
- [0142] ° IC 주사에 대한 금기를 초래한 머리/목 수술의 이력.
- [0143] ° CT(또는 조영제) 또는 일반적 마취에 대해 임의의 금기를 가짐.
- [0144] ° MRI(또는 가돌리늄)에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0145] ° 추정된 사구체 여과율(eGFR) <30mL/분/1.73m²를 가짐.
- [0146] · MPS I에 기인하지 않는 임의의 신경인지 결함 또는 신경 정신 의학적 병태의 진단을 가짐.
- [0147] · 타크롤리무스, 시롤리무스, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 또는 프레드니솔론 중 1종 이상에 대한 과민성 반응의 임의의 이력을 가또는 프레드니솔론.
- [0148] · 면역 억제 요법(예를 들어, 절대 호중구수 <1.3 x 10³개/μL, 혈소판 수 <100 x 10³개/μL 및 헤모글로빈 <12g/dL [남성] 또는 <10g/dL [여성])에 적절하지 않은 임의의 조건을 가짐.
- [0149] · 요추 천자에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0150] · HSCT를 겪음.
- [0151] · 치료 전 6개월 내에 IT 투여를 통해 라로니다제를 받음.
- [0152] · 언제라도 IT 라로니다제를 받거나 환자를 과도한 위험에 두는 IT 투여와 관련되는 것으로 고려되는 상당한 유해 사건을 경험함.
- [0153] · 치료 전 적어도 3개월 동안 완전한 관해가 없었던 피부의 편평 세포 또는 기저 세포 암종 이외의 림프종의 임의의 이력 또는 다른 암의 이력.
- [0154] · 환자가 질베르 증후군의 이전에 알려진 이력 및 총 빌리루빈의 35% 미만의 접합 빌리루빈을 나타내는 분획화된 빌리루빈을 갖지 않는다면, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) >3 x 정상 상한치(ULN) 또는 총 빌리루빈 >1.5 x ULN.
- [0155] · 인간 면역결핍 바이러스(HIV)-양성 검사의 이력, 활성 또는 재발 B형 또는 C형 간염의 이력 또는 B형 간염,

C형 간염 또는 HIV에 대한 양성 선별 검사.

- [0156] · 임신 중, 산후 6주 미만, 모유 수유 또는 임신 계획 중(자기 또는 배우자)
- [0157] · 치료 전 1년 이내에 알코올 또는 약물 남용의 이력.
- [0158] · 환자 안전성을 위태롭게 하는 심각한 또는 불안정한 의학적 또는 정신적 병태를 가짐.
- [0159] · 제어되지 않는 발작.
- [0160] 다른 실시형태에서, 담당 의사는 이들 신체 특징(의학적 이력) 중 하나 이상의 존재가 본 명세서에 제공된 바와 같은 치료를 불가능하게 하지 않아야 한다는 것을 결정할 수 있다.
- [0161] HSCT가 미국에서 MPS I를 갖는 어린이의 치료 기준임을 고려하여, 대상체는 18세 이상의 성인일 수 있다. 6세 이상의 어린이의 등록은 이 대상체에서 유전자 요법 후 8주에 안전성 문제가 확인되지 않은 경우에만 시작될 것이다.
- [0162] 다른 국가, 예를 들어, 브라질에서, HSCT 및/또는 ERT는 제한되지 않으며 혈러 증후군을 갖는 환자에서 충족되지 않은 의학적 필요성이 상당하다. 따라서, 3세 미만의 환자를 등록하는 것은 이들 환자가 rAAV9.hIDUA를 이용하는 치료로부터의 이익에 대하여 가장 큰 가능성을 갖기 때문에 정당화된다. 적합한 환자는 중증 형태의 MPS I를 갖는 것을 포함하고 초기 신경인지 결함에 대한 위험이 있다. AAV9.hIDUA의 약역학적 효과는 질환의 바이오마커를 이용하여 측정될 수 있고 혈러 증후군을 갖는 대상체에서 AAV9.hIDUA의 효능은 인지 기능을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0163] 이러한 집단에서, 환자는 다음 기준을 충족시킬 수도 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 다음 포함 기준 모두를 충족시켜야 한다.
- [0164] 1) 3세 미만의 남성 또는 여성
- [0165] 2) 대상체의 법적 보호자(들)는 연구의 성격이 설명된 이후, 및 임의의 연구-관련 절차 이전에 서면으로 된 서명된 사전 동의서를 기꺼이 제공할 수 있다.
- [0166] 3) 중증 MPS I-혈러의 기록된 진단을 가짐.
- [0167] 4) MPS I-혈러와 적합한 임상 징후 및 증상의 존재, 및/또는
- [0168] 5) 중증 표현형과 배타적으로 관련된 돌연변이에 대한 동형 접합성 또는 화합물 이형 접합성.
- [0169] 6) 55 이상의 지능지수(intelligent quotient: IQ)를 가짐.
- [0170] 7) 도움을 받아서 또는 도움 없이 필요한 프로토콜 검사를 완료하고, 적용 가능하다면, 검사일에 도움을 받아서 기꺼이 따르는 충분한 청각 및 시력을 가짐.
- [0171] 특정 실시형태에서, 다음 제외 기준 중 어느 것을 충족시키는 대상체의 치료는 치료에 부적합하다.
- [0172] 8) 다음 중 임의의 것을 포함하는 IC 주사에 대한 금기를 가짐:
 - [0173] a) 신경방사선학자/신경외과 의사의 중재위원회에 의한 기준 자기 공명 영상화(magnetic resonance imaging: MRI) 검사의 검토는 IC 주사에 대한 금기를 나타냄.
 - [0174] b) 신경방사선학자/신경외과 의사의 중재위원회에 의한 입수 가능한 정보의 검토에 기반하여, IC 주사에 대한 금기를 초래한 머리/목 수술의 이력.
 - [0175] c) 컴퓨터 단층촬영(CT)(또는 조영제) 또는 일반적 마취에 대해 임의의 금기를 가짐.
 - [0176] d) MRI(또는 가돌리늄)에 대한 임의의 금기를 가짐.
 - [0177] e) 추정된 사구체 여과율(eGFR) <30mL/분/1.73m²을 가짐.
- [0178] 9) MPS I에 기인하지 않는 임의의 신경인지 결함 또는 PI의 주장에 따라 연구 결과의 해석이 틀렸음을 증명할 수 있는 신경 정신 의학적 병태의 진단을 가짐.
- [0179] 10) 요추 천자에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0180] 11) 조혈모세포 이식(HSCT)을 겪음.

- [0181] 12) AAV-기반 유전자 요법 산물을 이용한 전처리를 받음.
- [0182] 13) 언제라도 척추강내(IT) 라로니다제를 받거나 PI의 주장에 따라 환자를 과도한 위험에 두는 IT 투여와 관련 되는 것으로 고려되는 상당한 AE를 경험함.
- [0183] 14) 림프종의 임의의 이력 또는 선별 전 적어도 3개월 동안 완전한 관해가 없었던 피부의 편평 세포 또는 기저 세포 암종 이외의 다른 암의 이력.
- [0184] 15) 최대 의학적 치료에도 제어되지 않는 고혈압(수축기 혈압 [BP] >180 mmHg, 확장기 BP >100 mmHg).
- [0185] 16) 마이크로리터(μ L) 당 혈소판 수 <100,000을 가짐.
- [0186] 17) 환자가 질베르 증후군의 이전에 알려진 이력을 갖지 않는다면, 선별시 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) >3 x 정상 상한치(ULN) 또는 총 빌리루빈 >1.5 x ULN을 가짐.
- [0187] 18) 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 B형 또는 C형 간염 바이러스 감염의 이력, 또는 B형 간염 표면 항원 또는 B형 간염 코어 항체, 또는 C형 간염 또는 HIV 항체에 대한 양성 선별 검사.
- [0188] 19) 사전 동의 형식(ICF)에 서명하기 전 30일 또는 5회 반감기 중 더 긴 기간 이내에 임의의 시험용 제품을 받 음.
- [0189] 20) 임상 현장 직원 또는 연구 수행에 수반되는 임의의 다른 개인의 1급 가족 구성원이거나, 또는 임상 현장 직 원 또는 연구 수행에 수반되는 임의의 다른 개인.
- [0190] 21) PI의 주장에 따라 대상체의 안전을 손상시키는 임상적으로 유의한 ECG 이상을 가짐.
- [0191] 22) PI의 주장에 따라 대상체의 안전 또는 연구에 성공적인 참여 또는 연구 결과의 해석을 손상시키는 심각하거 나 불안정한 의학적 또는 심리학적인 병태를 가짐.
- [0192] 23) 현장 신경방사선학자/신경외과 의사의 주장에 따라 그리고 의료용 모니터를 이용한 논의시, 대상체의 투여 및 적절한 주입에 영향을 미칠 수 있는 (대뇌) 뇌실측로술을 받음.
- [0193] 특정 실시형태에서, 대상체는 면역 억제 요법과 관련된 다음 기준에 따라 치료로부터 제한(제외)될 수도 있다:
- [0194] 21) 타크롤리무스, 시롤리무스, 또는 프레드니손에 대한 과민성 반응의 이력;
- [0195] 22) 원발성 면역결핍증(예를 들어, 보편적인 가변적 면역결핍 증후군), 비장 절제, 또는 대상체를 감염에 취약 하게 만드는 임의의 근본적인 병태의 이력.
- [0196] 23) 선별 전 적어도 12주에 완전히 해결되지 않은 대상포진, 시토메갈로바이러스, 또는 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr virus: EBV) 감염.
- [0197] 24) 방문 2 전에 적어도 8주에 해결되지 않은 입원 또는 비경구 항감염제로의 치료가 필요한 임의의 감염.
- [0198] 25) 방문 2 전 10일 내에 경구용 항감염제(항바이러스제 포함)를 필요로 하는 임의의 활성 감염.
- [0199] 26) 선별 동안 활성 결핵(tuberculosis: TB) 또는 양성 콧피페론-TB(positive Quantiferon-TB) 금 검사의 이력.
- [0200] 27) ICF에 서명하기 전 8주 이내에 임의의 살아있는 백신.
- [0201] 28) ICF에 서명하기 전 8주 이내에 큰 수술 또는 연구 기간 동안에 계획된 큰 수술.
- [0202] 29) 등록 6개월 이내에 아테노이드 절제술 또는 편도선 절제술에 대한 필요 예상. 아테노이드 절제술 또는 편도 선 절제술이 예상되면, 선별 전에 수행되어야 한다.
- [0203] 30) 절대 호중구 수 <1.3 x 10³/ μ L.
- [0204] 31) 임상이가 면역 억제 요법에 적절하지 않다고 믿는 임의의 병태 또는 실험실 이상.
- [0205] 5.2.2. 투약량 및 투여 방식
- [0206] 환자에 대한 투여에 적합한 약제학적 조성물은 생리적으로 적합한 수성 완충제, 계면활성제 및 선택적 부형제를 포함하는 제형 완충제 중에 rAAV.hIDUA 벡터의 현탁액을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약 제학적 조성물은 척추강내로 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 낭내로 투여

된다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 20분(± 5 분)에 걸쳐 주입에 의해 말초 정맥을 통해 전달된다. 그러나, 이 시간은 필요하다면 또는 요망된다면 조절될 수 있다. 그러나, 또 다른 투여 경로가 선택될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 투여 경로는 요망된다면 조합될 수 있다.

[0207] rAAV의 단일 투여가 효과적인 것으로 예상된다면, 투여는 반복될 수 있다(예를 들어, 분기별로, 2년마다, 1년마다 또는 달리 필요하다면, 특히 신생아의 치료에서). 선택적으로, 치료적 유효량의 초기 용량은 주입/주사를 용인하는 대상체의 연령 및 능력을 고려하여 분할 주입/주사 기간에 걸쳐 전달될 수 있다. 그러나, 전체 치료적 용량의 반복된 매주 주사는 요구되지 않으며, 편안하고 치료적인 결과 둘 다에 대해 환자에게 이점을 제공한다.

[0208] 일부 실시형태에서, rAAV 현탁액은 적어도 1×10^9 개의 GC/mL인 rAAV 게놈 복제물(GC) 역가를 가진다. 특정 실시형태에서, rAAV 현탁액 중의 rAAV 비어 있는 입자/차 있는 입자 비율은 0.01 내지 0.05(비어 있는 캡시드가 95% 내지 99% 없음)이다. 일부 실시형태에서, 치료가 필요한 MPS I 환자는 rAAV 현탁액의 적어도 약 4×10^8 개의 GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량의 용량이 투여된다.

[0209] MPSI 환자에 대한 rAAV.hIDUA의 치료적으로 유효한 척추강내/뇌내 용량은 약 1×10^{11} 내지 7.0×10^{14} GC(고른 용량)(10^9 내지 5×10^{10} GC/g 환자의 뇌질량과 동등함)의 범위이다. 대안적으로, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량은 표시된 연령 그룹의 환자에게 투여될 수 있다:

- [0210] · 신생아: 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0211] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0212] · 4개월 이상 내지 9개월 미만: 약 1.2×10^{12} 내지 약 6.0×10^{12} ;
- [0213] · 9개월 이상 내지 18개월 미만: 약 2×10^{12} 내지 약 1.0×10^{13} ;
- [0214] · 18개월 이상 내지 3세 미만: 약 2.2×10^{12} 내지 약 1.1×10^{13} ;
- [0215] · 9개월 내지 6세: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0216] · 3세 미만(3세까지의 신생아): 약 1×10^{11} 내지 약 1.2×10^{13} GC;
- [0217] · 3 내지 6세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0218] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0219] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;
- [0220] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.

[0221] 다른 실시형태에서, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량은 다음 나이 그룹의 MPS 환자에게 투여된다:

- [0222] · 신생아: 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC;
- [0223] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;
- [0224] · 4개월 이상 내지 9개월 미만: 약 6.0×10^{12} 내지 약 3.0×10^{13} ;
- [0225] · 9개월 이상 내지 18개월 미만: 약 1.0×10^{13} 내지 약 5.0×10^{13} ;
- [0226] · 18개월 이상 내지 3세 미만: 약 1.1×10^{13} 내지 약 5.5×10^{13} ;
- [0227] · 9 내지 36개월: 약 10^{13} 내지 약 5×10^{13} GC;

[0228] · 3세 미만(3세까지의 신생아): 약 1×10^{11} 내지 약 1.2×10^{13} GC;

[0229] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0230] · 3 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0231] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;

[0232] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.

[0233] 특정 실시형태에서, 이들 범위 중 하나 이상이 임의의 연령의 환자에 사용된다. 특정 실시형태에서, 1.2×10^{12} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 6×10^{12} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 4개월 이상 내지 9개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.2×10^{12} 개의 전체 GC(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량) 또는 1.1×10^{13} 개의 전체 GC(1×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 6.0×10^{12} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 3×10^{13} 개의 전체 게놈 복제물(GC)(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 4개월 이상 내지 9개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.0×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.0×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 9개월 이상 내지 18개월 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.1×10^{13} (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량) 또는 5.5×10^{13} 개의 전체 GC(5×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 18개월 이상 내지 3세 미만인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 2.6×10^{12} 개의 게놈 복제물(GC)(2.0×10^9 GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 1.3×10^{13} 개(GC)(1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량)의 고른 용량이 6세 이상인 환자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에게 투여되는 용량은 1.4×10^{13} 개의 게놈 복제물(GC)(1.1×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 일부 실시형태에서, 12+세 MPSI 환자(18+세를 포함)에게 투여되는 용량은 7×10^{13} 개의 GC(5.6×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 또한 추가의 실시형태에서, MPSI 환자에게 투여되는 용량은 적어도 약 4×10^8 개의 GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량이다. 특정 실시형태에서, MPS I 신생아에게 투여되는 용량은 약 1.4×10^{11} 내지 약 1.4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; 3 내지 9개월 영아에게 투여되는 용량은 약 2.4×10^{11} 내지 약 2.4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; MPS I 9 내지 36개월의 어린이에게 투여되는 용량은 약 4×10^{11} 내지 약 4×10^{14} 개의 GC의 범위이고; MPS I 3 내지 12세의 어린이에게 투여되는 용량은 약 4.8×10^{11} 내지 약 4.8×10^{14} 개의 GC의 범위이고; 12+세의 어린이 및 성인에게 투여되는 용량은 약 5.6×10^{11} 내지 약 5.6×10^{14} 개의 GC이다.

[0234] 이들 용량 및 농도의 전달을 위한 적합한 용적은 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 1 μ L 내지 150mL의 용적이 선택될 수 있으며, 성인에 대해 더 고용적이 선택된다. 전형적으로, 신생아 영아에 대해, 적합한 용적은 약 0.5mL 내지 약 10mL이고, 더 나이가 든 영아에 대해, 약 0.5mL 내지 약 15mL가 선택될 수 있다. 유아에 대해, 약 0.5mL 내지 약 20mL의 용적이 선택될 수 있다. 어린이에 대해, 약 30mL까지의 용적이 선택될 수 있다. 침대 초반 및 침대에 대해, 약 50mL까지의 용적이 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 약 5mL 내지 약 15mL의 용적 또는 약 7.5mL 내지 약 10mL의 용적이 선택된 척추강내 투여를 받을 수 있다. 다른 적합한 용적 및 투약량이 결정될 수 있다. 투약량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추도록 조절될 것이고, 이러한 투약량은 제조법 벡터에 대해 사용되는 치료적 용도에 따라 다를 수 있다.

[0235] 척추강내 전달에 대한 일 실시형태에서, 환자는 성인 대상체이고, 용량은 약 1×10^8 개의 GC 내지 5×10^{14} 개의 GC를 포함한다. 다른 실시형태에서, 용량은 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} 개의 GC를 포함한다. 추가 실시형태에서, 환자는 혈류 증후군을 갖는 적어도 약 3개월 내지 12개월령, 적어도 약 3개월 내지 24개월령, 또는 적

어도 약 3개월 내지 36개월령, 적어도 약 3개월 내지 6세, 적어도 6개월 내지 6세, 적어도 12개월 내지 6세의 영아 대상체이며, 용량은 4×10^8 개의 GC rAAV9.hIDUA/g 뇌 질량 내지 3×10^{12} 개의 GC rAAV9.hIDUA/g 뇌 질량의 적어도 증가를 포함한다. 다른 예에서, 환자는 혈러 증후군을 갖는 3세까지의 어린이이며, 용량은 적어도 4×10^8 개의 V9.hIDUA/g 뇌 질량 내지 5×10^{10} 개의 GC rAAV9.hIDUA/g 뇌 질량의 증가를 포함한다. 다른 예에서, 환자는 혈러-샤이에 증후군을 갖는 적어도 약 6세 내지 18세의 어린이이며, 용량은 적어도 4×10^8 개의 GC rAAV9.hIDUA/g 뇌 질량 내지 3×10^{12} 개의 GC rAAV9.hIDUA/g 뇌 질량의 증가를 포함한다.

[0236] 5.2.3. 효능 모니터링

[0237] 요법의 효능은 (a) MPSI를 갖는 환자에서 신경인지 쇠퇴의 예방; 및 (b) 질환의 바이오마커, 예를 들어, CSF, 혈청 및/또는 소변, 및/또는 간 및 비장 용적에서 GAG 수준 및/또는 효소 활성의 감소를 평가함으로써 측정될 수 있다. 신경인지는, 예를 들어, 혈러 대상체에 대한 베일리의 영아 발달 척도에 의해 측정하여 또는 혈러-샤이에 대상체에 대한 웨슬러 약식 지능 검사(WASI)에 의해 측정하여 지능지수(IQ)를 측정함으로써 결정될 수 있다. 신경인지 발달 및 기능의 다른 적절한 측정은, 예를 들어, 베일리 영아 발달검사(BSID-III)를 이용하는 발달지수(DQ) 평가, 홉킨스 언어 학습 검사를 이용하고/하거나 주의력 검사(TOVA)를 이용하는 기억 평가가 이용될 수 있다. 청력 변화는 청각 뇌간 반응(ABR) 검사에 의해 측정된다. 다른 신경심리학적 기능, 예컨대 바인랜드 적응 행동 척도(예를 들어, 바인랜드 II), 시각적 처리, 소근육 운동, 의사소통, 사회화, 일상 생활 기술 및 감정적 및 거동적 건강상태가 모니터링된다. 용적측정, 확산 텐서 영상(diffusion tensor imaging: DTI), 및 휴식 상태 데이터를 획득하기 위한 뇌의 자기 공명 영상화(MRI), 초음파 검사에 의한 정중 신경 단면적, 척수 압박의 개선, 안전성, 간 크기 및 비장 크기가 또한 투여된다.

[0238] 선택적으로, 효능의 다른 측정은 바이오마커(예를 들어, 스퍼민 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 폴리아민) 및 임상 결과의 평가를 포함할 수 있다. 소변은 총 GAG 함량, 크레아티닌에 대한 GAG의 농도뿐만 아니라 MPS I 특이적 pGAG에 대해 평가된다. 혈청 및/또는 혈장은 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, pGAG 및 헤파린 조인자 II-트롬빈 복합체의 농도 및 염증의 마커에 대해 평가된다. CSF는 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, 헥소사미니다제(hex) 활성, 및 pGAG(예컨대 헤파란 황산 및 더마탄 황산)에 대해 평가된다. 백터(예를 들어, AAV9)에 대한 중화 항체 및 항-IDUA 항체에 대한 결합 항체의 존재는 CSF 및 혈청에서 평가될 수 있다. 백터 캡시드(예를 들어, AAV9) 또는 hIDUA 이식유전자 산물에 대한 T-세포 반응은 ELISPOT 분석에 의해 평가될 수 있다. CSF, 혈청 및 소변뿐만 아니라 백터 농도(AAV9 DNA에 대해 PCR)에서 IDUA 발현의 약동학이 또한 모니터링될 수 있다.

[0239] hIDUA의 전신 전달에 의해 수반되는 CNS에 대한 rAAV.hIDUA의 유전자 요법 전달의 조합은 본 발명의 방법에 의해 포함된다. 전신 전달은 ERT(예를 들어, 알두라자임(등록상표)를 이용), 또는 간에 대해 친화성을 갖는 rAAV.hIDUA(예를 들어, AAV8 캡시드를 보유하는 rAAV.hIDUA)를 이용하는 추가적인 유전자 요법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0240] 전신 전달과 관련된 임상 효능의 추가적인 측정은, 예를 들어, 정형 외과적 측정, 예컨대 골밀도 검사, 골중미네랄 함량, 골 기하학 및 강도, 이중 에너지 x-선 흡광 광도법(DXA)에 의해 측정된 골밀도; 신장(연령에 대한 서 있는 신장/누워있는 신장에 대한 Z-스코어); 골대사의 마커: 혈청 오스테오칼신(OCN) 및 골-특이적 알칼리성 포스파타제(BSAP), I형 콜라겐의 카복시말단의 텔로펩타이드(ICTP) 및 I형 콜라겐의 카복시말단의 텔로펩타이드 $\alpha 1$ 체(CTX)의 측정; 가요성 및 근육 강도: 6분 보행 연구(바이오텍스(Biodex) III 등속속성 강도 시험 시스템은 각각의 참여자에 대한 무릎 및 팔꿈치에서의 강도를 평가하기 위해 사용됨); 능동적 관절 운동 범위(ROM); 어린이 건강 평가 질문지(Child Health Assessment Questionnaire)/건강 평가 질문지(Health Assessment Questionnaire)(CHAQ/HAQ) 장애 지표 스코어(Disability Index Score); 근전계(Electromyographic: EMG) 및/또는 개체의 심폐 세력 을 모니터링하기 위한 산소 이용: 운동 검사 동안의 최대 산소 흡수(VO_2 피크); 무호흡(Apnea)/호흡저하 지수(Hypopnea Index: AHI); 노력성 폐활량(FVC); 좌심실 질량(LVM)을 포함하는 바이오텍스 및 물리 치료 평가를 포함할 수 있다.

[0241] 특정 실시형태에서, 환자에서 MPSI를 진단하고/하거나 치료하거나, 또는 치료를 모니터링하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 MPSI를 갖는 것으로 의심되는 인간 환자로부터 뇌척수액 또는 혈장 샘플을 얻는 단계; 샘플 내 스퍼민 농도 수준을 검출하는 단계; 과량의 1ng/mL 로 스퍼민 농도를 갖는 환자에서 MPS I로부터 선택된 점액 다당류증으로 환자를 진단하는 단계; 및 본 명세서에 제공된 바와 같이 진단된 환자에게, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 이용하여 유효량의 인간 알파-L-이두로니다제(hIDUA)를 전달하는 단계를 수반한다.

- [0242] 다른 양상에서, 상기 방법은 MPSI 요법을 모니터링하는 단계 및 조절하는 단계를 수반한다.
- [0243] 이러한 방법은 MPSI에 대한 요법을 받는 인간 환자로부터 뇌척수액 또는 혈장 샘플을 얻는 단계; 질량 분석을 수행함으로써 샘플 내 스퍼민 농도 수준을 검출하는 단계; MPSI 치료제의 투약 수준을 조절하는 단계를 수반한다. 예를 들어, "정상" 인간 스퍼민 농도는 뇌척수액 중에서 약 1ng/mL 이하이다. 그러나, MPSI가 치료되지 않은 환자는 스퍼민 농도 수준이 2ng/mL 내지 약 100ng/mL일 수 있다. 환자가 정상 수준에 근접하는 수준을 가진다면, 임의의 동반 ERT의 투약량은 저하될 수 있다. 반대로, 환자가 목적으로 하는 스퍼민 수준보다 더 높은 스퍼민 수준을 가진다면, 더 고용량 또는 추가적인 요법, 예를 들어, ERT가 환자에게 제공될 수 있다.
- [0244] 적합한 분석을 이용하여 스퍼민 농도가 결정될 수 있다. 예를 들어, J Sanchez-Lopez, et al, "Underivatives polyamine analysis is plant samples by ion pair liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry," Plant Physiology and Biochemistry, 47 (2009): 592-598, avail online 28 Feb 2009; MR Hakkinen et al, "Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry", J Pharm Biomec Analysis, 44 (2007): 625-634에 기재되어 있는 분석, 정량적 동위원소 희석 액체 크로마토그래피(LC)/질량 분석법(MS). 다른 적합한 분석이 사용될 수 있다.
- [0245] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료적 효능은 초기 신경인지 결함이 있는 MPS I를 갖는 소아 대상체에서 투약 후 52주에 신경인지를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료 효능은 MPS I 환자에서 신경인지에 대한 CSF 글리코사미노글리칸(GAG)의 관계를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 자기 공명 영상화(MRI), 예를 들어, 회백질 및 백질 및 CSF 뇌실의 용적측정 분석에 의해 측정하여 MPS I 환자에서 CNS에 대한 신체 변화에 대한 치료 효과를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 뇌척수액(CSF), 혈청 및 소변에서 바이오마커(예를 들어, GAG, HS)에 대한 치료제의 약역학적 효과를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 삶의 질(QOL)에 대한 치료제의 영향을 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 운동 기능에 대한 치료제의 영향을 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 성장 시 그리고 발달 단계에서 치료제의 효과를 평가함으로써 결정된다.
- [0246] 본 명세서에 기재된 rAAV 벡터로부터 발현된 바와 같이, CSF, 혈청 또는 다른 조직 또는 유체에서 검출된 바와 같은 적어도 2%의 발현 수준은 치료 효과를 제공할 수 있다. 그러나, 더 높은 발현 수준이 달성될 수 있다. 이러한 발현 수준은 2% 내지 약 100%의 정상 기능 인간 IDUA 수준일 수 있다. 특정 실시형태에서, CSF, 혈청, 또는 다른 조직에서 정상 발현 수준보다 더 높게 검출될 수 있다.
- [0247] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 증상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 개선시키는 방법은 헐러 대상체에 대한 베일리 영아 발달 척도를 이용하여 평가하여 치료되는 환자에서 지능지수(IQ)의 상당한 증가를 초래한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 증상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 개선시키는 방법은 헐러-샤이에 대상체에 대한 웨슬러 약식 지능 검사(WASI)에 의해 측정하여 치료되는 환자에서 신경인지 IQ의 상당한 증가를 초래한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 증상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 개선시키는 방법은 베일리 영아 발달 척도를 이용하여 평가하여 치료되는 환자에서 신경인지 DQ의 상당한 증가를 초래한다.
- [0248] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 증상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 개선시키는 방법은 기능성 인간 IDUA 수준의 상당한 증가를 초래한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 증상을 치료하고/하거나 예방하고/하거나 개선시키는 방법은 환자의 혈청, 소변 및/또는 뇌척수액(CSF)의 샘플에서 측정하여 GAG 수준의 상당한 감소를 초래한다.
- [0249] 5.3. 조합 요법
- [0250] hIDUA의 전신 전달에 의해 수반되는 CNS에 대한 rAAV.hIDUA의 유전자 요법 전달의 조합은 본 발명의 방법에 의해 포함된다. 전신 전달은 ERT(예를 들어, 알두라자임(등록상표)를 이용), 또는 간에 대해 친화성을 갖는 rAAV.hIDUA(예를 들어, AAV8 캡시드를 보유하는 rAAV.hIDUA)를 이용하는 추가적인 유전자 요법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0251] 특정 실시형태에서, rAAV9.hIDUA의 척추강내 투여는 제2 AAV.hIDUA 주사와 공동투여되어, 예를 들어, 간으로 보내진다. 이러한 예에서, 벡터는 동일할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 동일한 캡시드 및/또는 동일한 벡터 게놈 서열을 가질 수 있다. 대안적으로, 벡터는 상이할 수 있다. 예를 들어, 각각의 벡터 저장액은 상이한 조절 서열

(예를 들어, 각각은 상이한 조직-특이적 프로모터를 가짐), 예를 들어, 간-특이적 프로모터 및 CNS-특이적 프로모터를 갖도록 설계될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 각각의 벡터 저장액은 상이한 캡시드를 가질 수 있다. 예를 들어, 간으로 보내지는 벡터 저장액은 특히 AAV8, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8, rh10, AAV3B 또는 AAVdj로부터 선택되는 캡시드를 가질 수 있다. 이러한 요법에서, 척추강내로 전달되는 총 벡터가 약 1×10^8 개의 GC 내지 1×10^{14} 개의 GC의 범위 내이고; 다른 실시형태에서, 경로 둘 다에 의해 전달되는 조합된 벡터가 1×10^{11} 내지 1×10^{16} 개의 범위에 있도록 각각의 벡터 저장액의 용량이 조절될 수 있다. 대안적으로, 각각의 벡터는 약 10^8 개의 GC 내지 약 10^{12} 개의 GC/벡터의 양으로 전달될 수 있다. 이러한 용량은 실질적으로 동시에 또는 상이한 시간에, 예를 들어, 약 1일 내지 약 12주 간격, 또는 약 3일 내지 약 30일, 또는 다른 적합한 시간에 전달될 수 있다.

[0252] 일부 실시형태에서, 환자는 간으로 보내지는 그리고 척추강내 주사를 통해 AAV.hIDUA가 공동투여된다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은: (a) MPS I 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 환자에게 충분한 양의 hIDUA 효소 또는 간으로 보내지는 rAAV-hIDUA를 투약하여 이식유전자-특이적 관용을 유도하는 단계; 및 (b) rAAV.hIDUA가 환자에서 치료적 수준의 hIDUA의 발현을 지시하는 환자의 CNS에 rAAV.hIDUA를 투여하는 단계를 포함한다.

[0253] 추가 실시형태에서, MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 환자에게 충분한 양의 hIDUA 효소 또는 간으로 보내지는 rAAV-hIDUA를 이용하여 관용 유도하여 환자에 대한 hIDUA의 이식유전자-특이적 관용, 다음에 CNS-관련 rAAV-매개 전달을 유도하는, MPSI 및/또는 혈러, 혈러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 인간 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, hIDUA에 대해 환자를 관용 유도하기 위해 환자가 4주령 미만(신생아기) 또는 영아일 때 환자는 간으로 보내지는 주사를 통해 rAAV.hIDUA가 투여되고, CNS 내 hIDUA의 치료 농도를 발현시키기 위해 환자가 영아, 어린이 및/또는 성인일 때 환자는 후속적으로 척추강내 주사를 통해 rAAV.hIDUA가 투여된다.

[0254] 일 예에서, MPSI 환자는 생후 약 2주 내에, 예를 들어, 약 0 내지 약 14일 또는 약 1일 내지 12일, 또는 약 3일 내지 약 10일, 또는 약 5일 내지 약 8일 내에 환자에게 hIDUA를 전달함으로써 관용 유도되며, 즉, 환자는 신생아이다. 다른 실시형태에서, 더 나이가 있는 영아가 선택될 수 있다. hIDUA의 관용 유도 용량은 rAAV를 통해 전달될 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, 상기 용량은 효소(효소 대체 요법)의 직접 전달에 의해 전달된다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 재조합 hIDUA 및 담배 세포[LH Fu, et al, Plant Science (Impact Factor: 3.61). 12/2009; 177(6):668-675] 또는 식물 종자[X He et al, Plant Biotechnol J. 2013 Dec; 11(9): 1034-1043]에서 가용성 rhIDUA를 생성하는 방법은 문헌에 기재되어 있다.

[0255] 추가적으로, 재조합 hIDUA는 알두라자임(등록상표)(라로니다제)으로서 상업적으로 생산되며; 항-인간 인슐린 수용체 단클론성 항체 및 알파-L-이두로니다제의 융합 단백질[AGT-181; ArmaGen, Inc]이 유용할 수 있다. 현재 덜 바람직하지만, 효소는 "네이키드(naked)" DNA, RNA 또는 다른 적합한 벡터를 통해 전달될 수 있다. 일 실시형태에서, 효소는 환자에게 정맥내로 및/또는 척추강내로 전달된다. 다른 실시형태에서, 다른 투여 경로(예를 들어, 근육내, 피하 등)가 사용된다. 일 실시형태에서, 관용 유도를 위해 선택된 MPSI 환자는 관용 유도 용량의 개시 전에 임의의 검출 가능한 양의 hIDUA를 발현시킬 수 없다. 재조합 인간 IDUA 효소가 전달될 때, 척추강내 rhIDUA 주사는 약 0.58mg/kg 체중 또는 약 0.25mg 내지 약 2 mg의 총 rhIDUA/주사(예를 들어, 정맥내 또는 척추강내)로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 3 cc의 효소(예를 들어, 대략 1.74mg 알두라자임(등록상표)(라로니다제))는 9 cc의 총 주사에 대해 6 cc의 엘리엇 B(등록상표) 용액으로 희석된다. 대안적으로, 더 고용량 또는 더 저용량이 선택된다. 유사하게는, 벡터로부터 발현될 때, 더 낮은 발현 단백질 수준이 전달될 수 있다. 일 실시형태에서, 관용 유도를 위해 전달되는 hIDUA의 양은 치료적 유효량보다 더 낮다. 그러나, 다른 용량이 선택될 수 있다.

[0256] 전형적으로, 관용 유도 용량의 투여 후에, 치료적 용량이 대상체에게, 예를 들어, 관용 유도 투약 후 약 3일 내지 약 6개월 내에, 더 바람직하게는, 관용 유도 투약 후 약 7일 내지 약 1개월 내에 전달된다. 그러나, 이들 범위 내의 다른 시점이 선택될 수 있으며, 대기 기간은 더 길거나 또는 더 짧을 수 있다.

[0257] 특정 실시형태에서, 면역 공동 요법은 본 명세서에 기재된 바와 같이 단독의 유전자 요법 벡터 또는 유전자 요법 벡터의 조합과 조합으로 전달될 수 있다. 대안으로서, 면역억제성 요법은 벡터 투여 전에, 동안에 및/또는 후속적으로 벡터에 추가로 주어질 수 있다. 면역억제성 요법은 상기 기재한 바와 같이 프레드니솔론, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스 또는 시롤리무스를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역 억제 요법

은 벡터 투약 전 약 2일에 시작할 수 있고 벡터 전 약 2일에 메틸프레드니솔론의 단일 정맥내 용량, 프레드니손의 경구 용량, 타크롤리무스의 경구 용량, 및 시롤리무스의 경구 용량을 포함할 수 있다. 프레드니손은 벡터 투여 전 약 2일부터 치료로부터의 약 16주까지 매일 경구로 투약된다. 타크롤리무스는 벡터 투여 전 약 2일부터 치료로부터의 약 24주까지 매일 경구로 투약된다. 특정 실시형태에서, 이하에 기재된 무 타크롤리무스 요법이 바람직할 수 있다. 시롤리무스는 벡터 투여 전 약 2일부터 치료로부터의 약 48주까지 매일 경구로 투약된다.

[0258] 특정 실시형태에서, 인간 환자에서 알파-L-이두로니다제 결핍증의 치료에 유용한 치료 요법은 다음을 환자에게 투여하는 단계를 수반한다: (a) AAV9 캡시드 및 환자에서 그 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 서열을 포함하는 핵산을 가진 재조합 AAV(rAAV)로서, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 이것은 기능성 hIDUA를 암호화하는 재조합 AAV; (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제; 및 (c) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제로서, 여기서 적어도 하나의 면역 억제제의 주입은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고; 면역 억제제 중 적어도 하나의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다. 환자는 처음에 정맥내로 스테로이드에 이어서 경구로 스테로이드가 투약될 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제의 조합은 하나 이상의 코르티코스테로이드 및 선택적으로, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF), 및/또는 칼시뉴린 저해제, 및/또는 mTOR 저해제를 포함한다. 하나 이상의 칼시뉴린 저해제는 타크롤리무스일 수 있다. 하나 이상의 mTOR 저해제는 템시롤리무스 또는 시롤리무스, 또는 다른 라파로그(예를 들어, 에버롤리무스)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자를 스테로이드로의 투약은 벡터 투약 후 12주에 중단된다. 특정 실시형태에서, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스는 벡터 투약 전 0일 내지 15일에 전달된다. 특정 실시형태에서, 면역 억제제는 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 시롤리무스이다.

[0259] 한 실시형태에서, 면역 억제제는 타크롤리무스 및 시롤리무스 둘 다를 포함하고, 약 4 ng/mL 내지 약 8 ng/mL, 또는 총 약 8 ng/mL 내지 약 16 ng/mL의 혈액 트로프 수준을 유지하기 위해 각각 저용량이 사용될 수 있다. 한 실시형태에서, 면역 억제제가 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나만을 포함하면, 총 용량은 약 16 ng/mL 내지 약 24 ng/mL의 범위이다. 특정 실시형태에서, 타크롤리무스 또는 시롤리무스 중 단 하나만이 사용되면, 초기 장입 용량은 약 3 mg/m²일 수 있다.

[0260] 특정 실시형태에서, 면역 억제 요법은 벡터 투여 전 약 -제14 일 내지 -제1 일에 시작된다.

[0261] 특정 실시형태에서, 암호화된 hIDUA는 다음으로부터 선택되는 서열을 갖는다: (a) 서열 번호 2의 약 아미노산 1 내지 약 653(젠뱅크 NP_000193); 또는 (b) 서열 번호 2의 약 산 27 내지 약 653에 융합된 이중성 리더 서열을 포함하는 합성 인간 효소.

[0262] 특정 실시형태에서, AAV 캡시드 내에 패키징된 핵산 서열은 5' 반전 말단 반복부(ITR) 서열, 님 베타 액틴 인트론, CB7 프로모터, 폴리 A 신호, 및/또는 3' ITR 서열을 더 포함한다.

[0263] 특정 실시형태에서, rAAV는 pH 6 내지 9를 갖는 현탁액 중에 있다.

[0264] 특정 실시형태에서, rAAV는 척추강내 주사를 통해 전달된다.

[0265] 특정 실시형태에서, 요법은 hIDUA 유전자를 포함하는 rAAV를 정맥내로 공동 투여하는 단계를 더 포함한다.

[0266] 특정 실시형태에서, 요법의 효능은 선택적으로 청성 뇌간 검사에 의해 청각 능력의 변화를 측정하는 것을 포함한다.

[0267] 특정 실시형태에서, 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 조성물이 제공되, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 서열 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 치료 요법에서와 같이 사용을 위해 기능성 hIDUA를 암호화하고 이것은 다음을 더 포함한다: (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 항-대사물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제; 및 (c) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 항-대사물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제로서, 여기서 면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고; 면역 억제제 중 적어도 하나의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다. 특정 실시형태에서, 마이크로라이드는 하나 이상의 항-칼시뉴린 저해제, 하나 이상의 mTOR 저해제, 또는 이들의 조합이다.

[0268] 특정 실시형태에서, 인간 α -L-이두로니다제(hIDUA)를 암호화하는 이중성 핵산을 포함하는 제조용 AAV 벡터와의 조합 요법에서 사용을 위해 적어도 하나의 면역 억제제를 함유하는 하나 이상의 조성물이 제공되며, 인간 hIDUA 암호 서열은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호 1에 대해 적어도 약 80% 동일한 서열을 가지며 이것은 기능성 hIDUA를 암호화하고, 면역 억제제는 다음을 포함한다: (a) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제1 면역 억제제를 포함하는 조성물; 및 (b) 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항물질, T-세포 저해제, 마이크로라이드, 또는 세포정지제 중 적어도 하나로부터 선택되는 적어도 제2 면역 억제제를 포함하는 조성물로서, 여기서 면역 억제제의 투약은 AAV 벡터의 전달 전에 또는 전달과 동일한 날에 시작하고; 면역 억제제 중 적어도 1종의 투약은 벡터 투여 후 적어도 8주 동안 지속된다. 특정 실시형태에서, 마이크로라이드는 하나 이상의 항-칼시뉴린 저해제, 하나 이상의 mTOR 저해제, 또는 이들의 조합이다.

[0269] 5.4. 제조

[0270] 본 발명은 본 명세서에 기재된 rAAV.hIDUA 약제학적 조성물의 제조를 제공한다(실시예 5, 이하 참조). 예시적 제조 공정은 도 11에서 제공된다. rAAV.hIDUA 벡터는 도 11에 나타난 흐름도에 나타난 바와 같이 제조될 수 있다. 간략하게, 세포는 적합한 세포 배양물(예를 들어, HEK 293) 세포에서 제조된다. 본 명세서에 기재된 유전자 요법을 제조하는 방법은 유전자 요법 벡터의 생성을 위해 사용되는 플라스미드 DNA의 생성, 벡터의 생성 및 벡터의 정제와 같이 당업계에 잘 공지된 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고, 생성된 플라스미드는 AAV 게놈 및 관심 대상의 유전자를 암호화하는 AAV 시스-플라스미드, AAV rep 및 cap 유전자를 포함하는 AAV 트랜스-플라스미드, 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드이다. 벡터 생성 공정은 세포 배양의 개시, 세포의 계대, 세포의 파종, 플라스미드 DNA를 이용하는 세포의 형질감염, 무혈청 배지에 대한 혈질감염 후 배지 교환, 및 벡터-포함 세포 및 배양 배지의 채취와 같은 방법 단계를 포함할 수 있다. 채취된 벡터-포함 세포 및 배양 배지는 본 명세서에서 조절의 세포 채취물로서 지칭된다.

[0271] 이후에 조절의 세포 채취물은 이후에 벡터 채취물의 농축, 벡터 채취물의 정용여과, 벡터 채취물의 미세유동화, 뉴클레아제 벡터 채취물의 분해, 미세유동화된 중간체의 여과, 크로마토그래피에 의한 조절의 정제, 초원심분리에 의한 조절의 정제, 접선유동여과에 의한 완충제 교환 및/또는 벌크 벡터를 제조하기 위한 제형 및 여과와 같은 방법 단계들이 실시될 수 있다.

[0272] 고염 농도에서 2단계 친화도 크로마토그래피 다음에 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 사용하여 벡터 약물 생성물을 정제하고 비어 있는 캡시드를 제거한다. 이들 방법은 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2016/065970 및 그의 우선권 기록, 2016년 4월 13일자로 출원된 미국 특허 출원 제62/322,071호 및 2015년 12월 11일자로 출원된 제62/226,357호(발명의 명칭: "Scalable Purification Method for AAV9"에 더 상세하게 기재되어 있으며, 이들은 본 명세서에 참고로 포함된다. AAV8에 대한 정제 방법, 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2016/065976 및 2016년 4월 13일자로 그의 우선권 출원된 미국 특허 출원 제62/322,098호 및 2015년 12월 11일자로 출원된 제62/266,341호, 및 rh10, 2016년 12월 9일자로 출원된 PCT/US16/66013 및 그의 우선권 문헌, 2016년 4월 13일자로 출원된 미국 특허 출원 제62/322,055호 및 또한 2015년 12월 11일자로 출원된 제62/266,347호(발명의 명칭: "Scalable Purification Method for AAVrh10" 및 AAV1에 대해, 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2016/065974 및 2016년 4월 13일자로 출원된 그의 우선권 미국 특허 출원 제62/322,083호 및 2015년 12월 11일자로 출원된 제62/26,351호(발명의 명칭: "Scalable Purification Method for AAV1"는 모두 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0273] 5.5 뇌척수액 내로 약제학적 조성물의 전달을 위한 장치 및 방법

[0274] 일 양상에서, 본 명세서에 제공된 벡터는 본 부문에 제공되고 실시예 및 도 12에 추가로 기재하는 방법 및/또는 장치를 통해 척추강내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 다른 장치 및 방법이 선택될 수 있다. 상기 방법은 환자의 대조 내로 스파이날 니들을 전진시키는 단계, 스파이날 니들의 근위 허브에 가요성 관의 길ibr 및 가요성 관의 근위 단부에 밸브의 배출 포트를 연결하는 단계, 및 상기 전진시키는 단계 및 연결하는 단계 후에 그리고 환자의 뇌척수액에 의해 관이 자기 프라이밍되도록 허용하는 단계 후에, 밸브의 플러시 유입 포트에 등장성 용액의 양을 수용하는 제1 용기를 연결하는 단계 및 이후에 밸브의 벡터 유입 포트에 약제학적 조성물의 양을 함유하는 제2 용기를 연결하는 단계를 포함한다. 밸브에 제1 용기 및 제2 용기를 연결한 후에, 유체에 대한 경로는 밸브의 벡터 유입 포트와 배출 포트 사이에서 개방되고, 약제학적 조성물은 스파이날 니들을 통해 환자에게 주사되고, 약제학적 조성물을 주사한 후에, 유체 유동을 위한 경로는 밸브의 플러시 유입 포트 및 배출 포트를 통해 개방되며 등장성 용액은 환자에게 약제학적 조성물을 플러시하기 위해 스파이날 니들 내로 주사된다.

- [0275] 다른 양상에서, 약제학적 조성물의 나내 전달을 위한 장치가 제공된다. 상기 장치는 약제학적 조성물의 양을 수용하는 제1 용기, 등장성 용액을 수용하는 제2 용기 및 약제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대조 내의 뇌척수액 내로 직접적으로 배출될 수 있는 스파이날 니들을 포함한다. 상기 장치는 추가로 제1 용기에 상호 연결된 제1 유입 포트를 갖는 밸브, 제2 용기에 상호 연결된 제2 유입 포트, 스파이날 니들에 상호 연결된 배출 포트 및 스파이날 니들을 통해 약제학적 조성물 및 등장성 용액의 유동을 제어하기 위한 루어락을 포함한다.
- [0276] 본 명세서에 사용되는 용어 컴퓨터 단층촬영(컴퓨터 단층촬영: CT)은 신체 구조의 3차원 영상이 축을 따라서 만들어진 일련의 평면 횡단 영상에 의해 구성되는 방사선 촬영을 지칭한다.
- [0277] 도 12에 나타내는 장치 또는 의학적 장치(10)는 밸브(16)를 통해 상호 연결되는 하나 이상의 용기(12 및 14)를 포함한다. 용기(12 및 14)는 약제학적 조성물, 약물, 백터 등의 물질의 신선한 공급원 및 등장성 용액, 예컨대 식염수의 신선한 공급원을 각각 제공한다. 용기(12 및 14)는 환자에게 유체의 주사를 가능하게 하는 임의의 형태의 의학적 장치일 수 있다.
- [0278] 예로서, 각각의 용기(12 및 14)는 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 예시된 실시형태에서, 용기(12)는 약제학적 조성물의 양을 수용하는 별개의 주사기로서 제공되고 본 명세서에서 "백터 주사기"로서 지칭된다. 단지 예시의 목적을 위해, 용기(12)는 약 10cc의 약제학적 조성물 등을 수용할 수 있다.
- [0279] 마찬가지로, 용기(14)는 식염수 용액의 양을 수용하는 별개의 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있고 "플러시 주사기"로서 지칭될 수 있다. 단지 예시의 목적을 위해, 용기(14)는 약 10cc의 식염수 용액을 수용할 수 있다.
- [0280] 대안으로서, 용기(12 및 14)는 주사기 이외의 형태로 제공될 수 있고, 단일 장치 내로 통합될 수 있으며, 예컨대 통합된 의학적 주사 장치는 한쌍의 별개의 챔버(약제학적 조성물에 대한 하나 및 식염수 용액에 대한 하나)를 가진다. 또한, 목적으로 하는 양의 유체를 수용하는 데 필요한 챔버 또는 용기의 크기가 제공될 수 있다.
- [0281] 도시된 실시형태에서, 밸브(16)는 스위블 수 루어락(18)을 갖는 4원 스태프로서 제공된다. 밸브(16)는 용기(12 및 14)(즉, 예시된 실시형태에서 백터 주사기 및 플러시 주사기)를 상호 연결하며, 스위블 수 루어락은 경로가 각각의 용기(12 및 14)에 대해 폐쇄 또는 개방될 밸브(16)를 통하는 것을 가능하게 한다. 이런 방법으로, 밸브(16)를 통한 경로는 백터 주사기와 플러시 주사기 둘 다에 대해 폐쇄될 수 있거나 또는 백터 주사기 및 플러시 주사기 중 선택된 하나에 대해 개방될 수 있다. 4-원 스태프에 대한 대안으로서, 밸브는 3-원 스태프 또는 유체 제어 장치일 수 있다.
- [0282] 예시된 실시형태에서, 밸브(16)는 유체에 대한 연장 관(20) 등 도관의 길이부 중 하나의 단부에 연결된다. 관(20)은 목적으로 하는 길이 또는 내부 용적에 기반하여 선택될 수 있다. 단지 예로서, 관은 길이가 약 6 내지 7일 수 있다.
- [0283] 예시된 실시형태에서, 관(12)의 맞은편 단부(22)는 T-커넥터 연장 세트(24)에 연결되며, 이는 결국 스파이날 니들(26)에 연결된다. 예로서, 니들(26)은 5인치, 22 또는 25-게이지 스파이날 니들일 수 있다. 추가로, 선택사항으로서, 스파이날 니들(26)은 삽입기 니들(28), 예컨대 3.5 인치, 18-게이지 삽입기 니들에 연결될 수 있다.
- [0284] 사용 시, 스파이날 니들(26) 및/또는 선택적 삽입기 니들(28)은 대조를 향해 환자 내로 전진될 수 있다. 니들 전진 후에, 니들(26 및/또는 28) 및 적절한 연조직(예를 들어, 근육횡단면적, 뼈, 뇌줄기 및 척수)의 시각화를 허용하는 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상이 얻어질 수 있다. 정확한 니들 위치는 니들 허브 내 뇌척수액(CSF)의 관찰 및 대조 내의 니들팁의 시각화에 의해 확인된다. 이후에, 상대적으로 짧은 연장관(20)이 삽입된 스파이날 니들(26)에 부착될 수 있고, 이어서, 4-원 스태프(16)가 관(20)의 맞은편 단부에 부착될 수 있다.
- [0285] 상기 조립체는 환자의 CSF에 의해 "자기-프라이밍"되도록 허용된다. 이후에, 사전 충전된 생리 식염수 플러시 주사기(14)는 4원 스태프(16)의 플러시 유입 포트에 부착되고, 이어서, 약제학적 조성물을 수용하는 백터 주사기(12)는 4-원 스태프(16)의 백터 유입 포트에 부착된다. 이후에, 스태프(16)의 배출 포트는 백터 주사기(12)에 대해 개방되고, 백터 주사기의 내용물은 밸브(16) 및 조립된 장치를 통해 그리고 시간 기간에 걸쳐 환자 내로 서서히 주사될 수 있다. 단지 예시적 목적을 위해, 시간 기간은 대략 1 내지 2분 및/또는 임의의 다른 요망되는 시간일 수 있다.
- [0286] 백터 주사기(12)의 내용물이 주사된 후에, 스태프(16) 및 니들 조립체가 부착된 사전충전 플러시 주사기(14)를 이용하여 목적으로 하는 양의 생리 식염수에 의해 플러시될 수 있도록 스태프(16) 상의 스위블 락(18)은 제2 위치로 전환된다. 단지 예시적 목적을 위해, 필요하다면 더 많은 또는 더 적은 양이 사용될 수 있지만, 1 내지

2cc의 생리 식염수가 사용될 수 있다. 생리 식염수는 모든 또는 대부분의 약제학적 조성물이 조립된 장치를 통해 그리고 환자에게 주사되도록 그리고 약제학적 조성물이 조립 장치 내에 거의 또는 전혀 남아있지 않도록 보장한다.

- [0287] 조립된 장치가 식염수에 의해 플러시된 후에, 전체적으로 니들(들), 연장관, 스탑콕 및 주사기를 포함하는 조립 장치는 대상체로부터 서서히 제거되고, 생물학적으로 위험한 폐기물 리셉터클(receptacle) 또는 딱딱한 컨테이너(니들(들)용)에 버리기 위한 수술 트레이 상에 놓인다.
- [0288] 선별 과정은 궁극적으로 낭내(IC) 절차를 야기할 수 있는 원칙적 연구자에 의해 착수될 수 있다. 원칙적 연구자는 과정, 절차, 투여 절차 그 자체, 및 완전히 알게 될 대상체(또는 지정된 간병인)에 대한 모든 잠재적 안전성 위험을 설명할 수 있다. 의학적 이력, 동시 의약, 신체 검사, 활력 징후, 심전도(ECG) 및 실험실 검사 결과가 얻어지거나 또는 수행되고, IC 절차에 대한 대상체의 적격성의 평가를 선별함에 있어서 사용하기 위해 신경방사선학자, 신경외과 의사 및 마취과 의사에게 제공된다.
- [0289] 적격성을 검토하기 위한 적절한 시간을 허용하기 위해, 다음의 절차는 제1 선별 방문과 연구 방문 전 1주까지 사이의 임의의 시간에 수행될 수 있다. 예를 들어, "제0일"에, 가돌리늄을 이용하는 그리고 없는(즉, eGFR >30mL/분/1.73m²) 두/경부 자기 공명 영상화(MRI)가 얻어질 수 있다. 두/경부 MRI에 추가로, 연구자는 횡/연장 연구를 통해 경부의 임의의 추가적인 평가에 대한 필요를 결정할 수 있다. MRI 프로토콜은 T1, T2, DTI, FLAIR 및 CINE 프로토콜 영상을 포함할 수 있다.
- [0290] 추가로, 두/경부 MRA/MRV는 CSF 유동의 적절한 평가 및 CSF 공간 사이의 통신의 가능한 차단 또는 결여의 확인을 허용하는 협회 프로토콜에 따라 얻을 수 있다(즉, 경막내/경정막 수술 이력이 있는 대상체는 제외될 수 있거나 또는 추가적인 검사(예를 들어, 방사성뉴클레오타이드 뇌조영술)가 필요할 수 있음).
- [0291] 신경방사선학자, 신경외과 의사 및 마취과 의사는 궁극적으로 모든 이용 가능한 정보(스캔, 의학적 이력, 신체 검사, 실험실 등)에 기반한 IC 절차에 대해 각각의 대상체의 적격성을 논의하고 결정한다. MPS 대상체의 전문적인 생리적 필요를 유념해 두고 기도, 경부(단축/비후화) 및 두부 운동 범위(경부 구부러짐 정도)의 상세한 평가를 제공하는 "-제28일" 내지 "제1일"에 마취 수술전 평가를 또한 얻을 수 있다.
- [0292] IC 절차 전에, CT 스위트는 다음의 장비를 확인하고, 의약이 제공될 것이다:
- [0293] 성인 요추 천자(LP) 키트(기관마다 공급됨);
- [0294] BD(백톤 딕킨슨(Becton Dickinson)) 22 또는 25 게이지 x 3 - 7"스파이날 니들(퀸케 베벨(Quincke bevel));
- [0295] (스파이날 니들의 도입을 위해) 중재자(interventionalist)의 판단 시 사용되는 공축 삽입기 니들;
- [0296] 스위블(스핀) 수 루어락을 갖는 4원 스몰 보어(small bore) 스탑콕;
- [0297] 대략의 길이가 6.7 인치인 암 루어락 어댑터를 갖는 T-커넥터 연장 세트(관);
- [0298] 척추강내 투여를 위한 옴니파큐(Omnipaque) 180(이오헥솔);
- [0299] 정맥내(IV) 투여를 위한 요오드화된 조영제;
- [0300] 1% 리도카인 주사용 용액(성인 LP 키트에서 공급되지 않는다면);
- [0301] 사전 충전된 10cc 생리 식염수(멸균) 플러시 주사기;
- [0302] 방사선 불투과성 마커(들);
- [0303] 수술 준비 장비/면도기;
- [0304] 베개/삽관한 대상체의 적절한 자세를 허용하는 지지체;
- [0305] 기관내 삽관 장비, 일반적 마취 기계 및 기계적 벤틸레이터;
- [0306] 수술 중 신경계 추적감시(IONM) 장비(및 필요한 인원); 및
- [0307] 벡터를 함유하는 10cc 주사기; 별개의 조제 매뉴얼에 따라 CT/수술실(OR) 시설에 준비되고 수송됨.
- [0308] 절차에 대한 사전동의를 확인하고 의학적 기록 및/또는 연구 파일에 기록함. 시설의 필요에 따라 방사선학 및 마취과 스태프로부터의 절차에 대한 별개의 동의를 얻는다. 대상체는 시설 가이드라인에 따른 적절한 병원 치료 병동(예를 들어, 2개의 IV 접근 장소) 내에서 정맥내 접근에 놓인다. 정맥내 유체는 마취과 의사의 재량으로 투

여된다. 마취과 의사의 재량으로 그리고 시설 가이드라인에 따라, 대상체는 적절한 환자 치료 병동, 대기구역 또는 수술적/CT 절차 시설 내 일반적 마취제의 투여와 함께 기관내 삽관이 유도되고 겪을 수 있다.

- [0309] 요추 천자를 수행하여 처음에 5cc의 뇌척수액(CSF)을 제거하고 그리고 후속적으로 대조의 시각화를 돕도록 조영제(옵니파크 180)를 척추강내로 주사하였다. 적절한 대상체 자세 조작을 수행하여 대조 내로 조영제의 확산을 용이하게 할 수 있다.
- [0310] 수술 중 신경계 추적감시(IONM) 장비를 대상체에게 부착한다. 대상체는 복와 또는 측와위 자세로 CT 스캐너 테이블 상에 위치된다. 이동 및 자세잡기 동안 대상체 안전성을 보장하기 위해 적절한 스태프가 제공되어야 한다. 적절한 것으로 여겨진다면, 대상체는 수술전 평가 동안 안전한 것으로 결정된 정도로 경부 구부림을 제공하는 방식으로 그리고 자세잡기 후에 기록된 정상 신경 생리학적 모니터 신호에 의해 자세를 잡을 수 있다.
- [0311] 다음의 스태프가 제공되고 현장에서 확인될 수 있다: 절차를 수행하는 중재자/신경외과의사; 마취과 의사 및 호흡 전문의(들); 간호사 및 의사 보조자; CT(또는 OR) 전문가; 신경생리학 전문의; 및 장소 코디네이터. "중간 휴식"은 올바른 대상체, 절차, 장소, 자세잡기 및 수술실 내 모든 필요한 장비를 확인하는 관절 위원회/병원 프로토콜에 따라 완료될 수 있다. 이어서, 주요 현장 연구자는 그/그녀가 대상체의 준비를 진행시킬 수 있다는 것을 스태프와 함께 확인할 수 있다.
- [0312] 두개저 하의 대상체의 피부는 적절하게 삭발된다. CT 스카우트 영상이 수행된 후에, 표적 위치를 국소화하고 혈관을 영상화하는 것이 중재자에 의해 필요한 것으로 여겨진다면, IV 조영제를 이용하여 사전 절차 계획 CT를 수행한다. 표적 부위(대조)를 동정하고 니들 궤적을 계획한 후에, 기관의 가이드라인에 따라 피부를 준비하고 멸균 기법을 이용하여 감싼다. 방사선 불투과성 마커를 중재자에 의해 표시되는 표적 피부 위치 상에 둔다. 마커 하의 피부를 1% 리도카인을 이용하는 침윤을 통해 마취시킨다. 22G 또는 25G 스파이날 니들은 공축 삽입기 니들의 사용을 위한 선택사항과 함께 대조를 향해 전진된다.
- [0313] 니들 전진 후에, 협회 장비를 이용하여 실현 가능한 가장 얇은 CT 슬라이스 두께(이상적으로는 2.5mm 이하)를 이영하여 CT 영상이 얻어진다. 니들 및 적절한 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 뼈, 뇌줄기 및 척수)의 적절한 시각화를 허용하는 가장 낮은 방사선량을 이용하는 일련의 CT 영상이 얻어진다. 정확한 니들 위치는 니들 허브 내 CSF의 관찰 및 대조 내의 니들팁의 시각화에 의해 확인된다.
- [0314] 중재자는 벡터 주사기가 멸균장에 가깝지만, 밖에 위치된다는 것을 확인한다. 벡터 주사기에서 약제학적 조성물을 조절 또는 투여하기 전에, 멸균장 내의 절차를 보조하는 스태프에 의해 장갑, 마스크 및 보안경이 착용된다.
- [0315] 연장관은 삽입된 스파이날 니들에 부착되는데, 이는, 그 다음에 4원-스탑콕에 부착된다. 일단 이 장치에 대상체의 CSF에 의해 "자기-프라이밍"된다면, 10cc 사전충전 생리 식염수 플러시 주사기는 4원 스태프의 플러시 유입 포트에 부착된다. 이어서, 벡터 주사기는 중재자에게 제공되고, 4-원 스태프 상의 벡터 유입 포트에 부착된다.
- [0316] 제1 위치에서 스태프의 스위블 락을 위치시킴으로써 스태프의 배출 포트가 벡터 주사기에 대해 개방된 후에, 벡터 주사기의 함량은 주사 동안 주사기의 플러저 상으로 과도한 힘을 적용하지 않도록 조심해서 서서히(대략 1 내지 2분에 걸쳐) 주사된다. 벡터 주사기의 내용물이 주사된 후에, 마개 및 니들 조립체가 부착된 사전충전 플러시 주사기를 이용하여 1 내지 2cc의 생리 식염수에 의해 플러시될 수 있도록 스태프의 스위블 락은 제2 위치로 전환된다.
- [0317] 준비가 될 때, 그 다음에 중재자는 그/그녀가 대상체로부터 장치를 제거할 것임을 스태프에게 알린다. 일회의 움직임에서, 니들, 연장관, 스태프 및 주사기는 대상체로부터 서서히 제거되고, 생물학적으로 위험한 폐기물 리셉터클 또는 딱딱한 컨테이너(니들(들)용)에 버리기 위한 수술 트레이 상에 놓인다.
- [0318] 니들 삽입 부위는 출혈 또는 CSF 누출의 징후에 대해 시험되고, 연구자에 의해 표시되는 바와 같이 치료된다. 표시하는 바와 같이 거즈, 수술용 테이프 및/또는 테가덤(Tegaderm) 드레싱을 이용하여 부위를 드레싱한다. 이어서, 대상체를 CT 스캐너로부터 제거하고 나서, 들것에 양와위로 위치시킨다. 이동 및 자세잡기 동안 대상체 안전성을 보장하기 위해 적절한 직원이 제공된다.
- [0319] 마취는 중단되고, 대상체는 마취후 치료를 위한 협회의 가이드라인에 따라 치료된다. 신경생리학적 모니터를 대상체로부터 제거한다. 대상체가 누워있는 들것의 머리부를 회복 동안 약간 높여야 한다(대략 30도). 대상체를 협회 가이드라인에 따라 적합한 마취후 치료실로 이동시킨다. 대상체는 적절하게 의식이 회복되고 안정한 상태가 된 후에, 그/그녀는 프로토콜 규정 평가를 위해 적절한 바닥/병실로 들어갈 것이다. 신경학적 평가는 프로토콜에 따를 것이며, 1차 연구자는 병원 및 연구 스태프와의 협진으로 대상체 치료를 감독한다.

- [0320] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물의 전달 방법은 하기 단계들을 포함한다: 환자의 대조 내로 스파이날 니들을 전진시키는 단계;
- [0321] 스파이날 니들의 근위 허브에 가요성 관의 길이브 및 가요성 관의 근위 단부에 밸브의 배출 포트를 연결하는 단계, 및 상기 전진시키는 단계 및 연결하는 단계 후에 그리고 환자의 뇌척수액에 의해 관이 자기 프라이밍되도록 허용하는 단계 후에, 밸브의 플러시 유입 포트에 등장성 용액의 양을 수용하는 제1 용기를 연결하는 단계 및 이후에 밸브의 벡터 유입 포트에 약제학적 조성물의 양을 함유하는 제2 용기를 연결하는 단계; 상기 제1 용기 및 제2 용기를 밸브에 연결한 후에 벡터 유입 포트와 밸브의 배출 포트 사이의 유체 유동을 위한 경로를 개방하는 단계 및 스파이날 니들을 통해 환자에게 약제학적 조성물을 주사하는 단계; 그리고 약제학적 조성물을 주사한 후에, 플러시 유입 포트 및 밸브의 배출 포트를 통해 유체 유동을 위한 경로를 개방시키고 스파이날 니들 내로 등장성 용액을 주사하여 환자에게 약제학적 조성물을 플러시하는 단계. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 스파이날 니들의 허브에 관 및 밸브를 연결하기 전에 대조 내에서 스파이날 니들의 원위 팁의 적절한 위치를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 확인하는 단계는 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상화를 이용하여 대조 내에서 스파이날 니들의 원위팁을 시각화하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 확인하는 단계는 스파이날 니들의 허브에서 환자의 뇌척수액의 존재를 관찰하는 것을 포함한다.
- [0322] 상기 기재한 방법에서, 상기 밸브는 벡터 유입 포트로부터 배출 포트까지 유동을 허용하는 한편 동시에 플러시 유입 포트를 통해 유동을 차단하는 제1 위치에 적합하고, 플러시 유입 포트로부터 배출 포트까지 유동을 허용하는 한편 동시에 벡터 유입 포트를 통해 유동을 차단하는 제2 위치에 적합한 스위블 루어락을 갖는 스탑콕일 수 있다, 스위블 루어락은 상기 약제학적 조성물이 환자에게 주사될 때 상기 제1 위치에 위치되고, 상기 약제학적 조성물이 등장성 용액에 의해 상기 환자에게 플러싱 중일 때 상기 제2 위치에 위치된다. 특정 실시형태에서, 환자에게 약제학적 조성물을 플러시하기 위해 스파이날 니들 내로 등장성 용액을 주사한 후에, 스파이날 니들은 관, 밸브, 및 조립체로서 연결된 제1 및 제2 용기를 이용하여 환자로부턴 회수된다. 특정 실시형태에서, 밸브는 스위블 수 루어락을 갖는 4-원 스탑콕이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, T-커넥터는 스파이날 니들의 허브에 위치되고, 스파이날 니들의 관을 상호연결한다. 선택적으로, 스파이날 니들은 스파이날 니들의 원위 단부에서 삽입기 니들을 포함한다. 스파이날 니들은 5인치, 22 또는 24-게이지 스파이날 니들일 수 있다. 특정 실시형태에서, 삽입기 니들은 3.5 인치, 18 게이지 삽입기 니들이다.
- [0323] 특정 양상에서, 상기 방법은, 최소로, 약제학적 조성물의 양을 수용하기 위한 제1 용기, 등장성 용액을 수용하기 위한 제2 용기 및 약제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대조 내의 뇌척수액 내로 직접적으로 배출될 수 있는 스파이날 니들; 및 v제1 용기에 상호 연결된 제1 유입 포트를 갖는 밸브, 제2 용기에 상호 연결된 제2 유입 포트, 스파이날 니들에 상호 연결된 배출 포트 및 스파이날 니들을 통해 약제학적 조성물 및 등장성 용액의 유동을 제어하기 위한 루어락으로 구성된 장치를 이용한다. 특정 실시형태에서, 상기 밸브는 제1 유입 포트로부터 배출 포트까지 유동을 허용하는 한편 동시에 제2 유입 포트를 통해 유동을 차단하는 제1 위치에 적합하고, 제2 유입 포트로부터 배출 포트까지 유동을 허용하는 한편 동시에 제1 유입 포트를 통해 유동을 차단하는 제2 위치에 적합한 스위블 루어락을 갖는 스탑콕일 수 있다. 선택적으로, 밸브는 스위블 수 루어락을 갖는 4-원 스탑콕이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, 스파이날 니들은 가요성 관의 길이를 통해 밸브에 상호연결된다. T-커넥터는 스파이날 니들에 관을 상호연결시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 스파이날 니들은 5인치, 22 또는 24-게이지 스파이날 니들이다. 특정 실시형태에서, 상기 장치는 스파이날 니들의 원위 단부에 연결된 삽입기 니들을 추가로 포함한다. 선택적으로, 삽입기 니들은 3.5 인치, 18 게이지 삽입기 니들이다.
- [0324] 이 방법 및 이 장치는 각각 선택적으로 본 명세서에 제공된 조성물의 척추강내 전달을 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 다른 방법 및 장치는 이러한 척추강내 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0325] 다음의 실시예는 단지 예시적이며, 본 명세서에 기재된 본 발명에 대한 제한이 아니다.
- [0326] 6. 실시예
- [0327] 실시예 1: 인간 대상체의 치료를 위한 프로토콜
- [0328] 본 실시예는 MPS I를 갖는 환자에 대한 유전자 요법 치료에 관한 것이다. 본 실시예에서, 유전자 요법 벡터인 AAV9.CB7. hIDUA, 즉, 야생형 hIDUA 효소를 암호화하는 변형된 hIDUA 유전자를 발현시키는 복제 결합 아데노-연관 바이러스 벡터 9(AAV9)는 MPSI 환자의 중추 신경계(CNS)에 투여된다. AAV 벡터의 용량은 일반적 마취 하에 CNS 내로 직접적으로 주사된다. 치료 효능은 바이오마커, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 대상체의 CSF 또는 혈

청 중의 병원성 GAG 및/또는 핵소사미니다제 농도의 감소를 포함하는, 신경인지 발달 및/또는 대리 마커의 임상 측정을 이용하여 평가된다.

[0329] A. 유전자 요법 벡터

[0330] 예시적인 유전자 요법 벡터, AAV9.CB.hIDUA는 실시예 3에 기재되어 있다. 이식유전자 카세트로부터의 발현은 CB7 프로모터, CMV 급초기 인핸서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 사이의 혼성체에 의해 유도되는 한편, 이 프로모터로부터의 전사는 닭 베타 액틴 인트론(CI)의 존재에 의해 향상된다. 발현 카세트에 대한 폴리A 신호는 RBG 폴리A이다. 벡터는 제형 완충제(엘리엇 B 용액, 0.001% 플루로닉 F68] 중에서 현탁된다. 제조 과정은 이하의 실시예 5에 더 상세하게 기재되어 있다.

[0331] B. 투약 및 투여 경로

[0332] 6세 이상의 환자는 2.6×10^{12} 개의 GC(2.0×10^9 개의 GC/g 뇌 질량)(저용량) 또는 1.3×10^{13} 개의 GC(1.0×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량(고용량)의 rAAV9.CB7.hIDUA의 단일 척추강내/낭내 용량을 받는다. 벡터의 투여를 위해, 대상체는 일반적 마취하에 둔다. 요추 천자를 수행하여 처음에 5 cc의 CSF를 제거하고 그리고 후속적으로 대조의 시각화를 돕도록 조영제 IT를 주사하였다. CT(조영제와 함께)를 이용하여 바늘 삽입 및 rAAV9.CB7.hIDUA의 후두골 공간 내로의 투여를 가이드한다. 면역억제 요법을 벡터에 추가로 제공할 수 있다.

[0333] 다른 실시형태에서, 중증 MPIS 표현형(혈러 증후군)을 가진 3세 미만(<3)의 대상체는 혈러 증후군을 야기하는 것으로 알려진 돌연변이(들)에 의해 확인될 수 있고 0.001% 플루로닉(등록상표) F68이 들어있는 변형된 엘리엇 B(등록상표) 용액 중의 rAAV9.CB7.hIDUA로 치료될 수 있다. 특정 실시형태에서, 조성물은 2가지 투약 수준 중 하나로의 낭내 투여를 통해 단일 용량으로 투여된다: 1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량 및 5×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량. 대상체는 IP의 1회 초과 용량을 받지 않을 것이다. 벡터 투여는 상기 기재된 바와 같다. 제안된 시작 임상 용량은 1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량이다. 시작 용량은 MPS I를 갖는 미경험(관용 유도되지 않음) 개에서 독성이 관찰되는 용량(1×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량)보다 100배 더 낮고 GLP 독성 연구에서 NHP에서 검사된 최저 용량(1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량)과 유사하다. 요약하면, 시작 용량으로 1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량의 선택은 다음 이유에 대하여 정당화된다: a) 이것은 임상적 이점의 합리적인 가능성을 갖는 최저 용량이고 b) 그것은 MPS I의 개 모델에서 독성이 관찰되는 용량에 대하여 합리적인 안전 여유를 유지하고 NHP에서 NOAEL이 동정되지 않지만, 조직병리학적 결과에 관한 용량 반응의 부재시, 용량을 더 낮추는 것은 이 잠재적인 유해한 결과의 위험을 변화시키지 않을 것으로 예상된다. 중요하게는, NHP 중 아무 것도 조직병리학적 결과와 관련된 임의의 임상 징후를 나타내지 않았다. 5×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량의 더 높은 용량은 MPS I 개에서 독성이 관찰되는 용량(1×10^{12} 개의 GC/g 뇌 질량)보다 대략 20배 더 낮고 본 명세서에서 기재된 GLP 독성 연구에서 NHP에서 검사된 최고 용량(1.1×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량)보다 대략 2배 더 낮다.

[0334] 연령별로 투여된 총 용량

투약시 대상체의 연령	추정 뇌 질량 (g)	용량 1 총 GC (1.0×10^{10} GC/g 뇌 질량)	용량 2 총 GC (5×10^{10} GC/g 뇌 질량)
4개월 이상 내지 9개월 미만	600	6.0×10^{12}	3.0×10^{13}
9개월 이상 내지 18개월 미만	1000	1.0×10^{13}	5.0×10^{13}
18개월 이상 내지 3세 미만	1100	1.1×10^{13}	5.5×10^{13}

투약시 대상체의 연령	추정 뇌 질량 (g)	용량 1 총 GC (2.0×10^9 GC/g 뇌 질량)	용량 2 총 GC (1×10^{10} GC/g 뇌 질량)
4 개월 이상 내지 9개월 미만	600	1.2×10^{12}	3.0×10^{13}
9 개월 이상 내지 18개월 미만	1000	2×10^{12}	5.0×10^{13}
18 개월 이상 내지 3세 미만	1100	2.2×10^{12}	5.5×10^{13}

[0335]

[0336] AAV9.hIDUA를 용량 제제의 일부로서 거의 생리학적인 조건으로 pH를 조절하기 위해 희석제(조성물에서 제형 완충제와 유사함)를 사용하여 무균 희석한다. 투여 전에 적절한 희석이 이루어진 후 더 낮은 용량 및 더 높은 용량에 대하여 전달된 산물의 총 용적은 10 mL 이하일 것이다. 다음 치료적으로 유효한 고른 용량을 표시된 나이 그룹의 환자에게 투여한다:

[0337] · 신생아: 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0338] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0339] · 9개월 내지 6세: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0340] · 3 내지 6세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0341] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0342] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;

[0343] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.

[0344] 다른 실시형태에서, 다음 치료적으로 유효한 고른 용량을 다음 나이 그룹의 MPS 환자에게 투여한다:

[0345] · 신생아: 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC;

[0346] · 3 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0347] · 9 내지 36개월: 약 10^{13} 내지 약 5×10^{13} GC;

[0348] · 6 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

- [0349] · 3 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;
- [0350] · 12+세: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;
- [0351] · 18+세(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.
- [0352] 환자에게 투여되는 rAAV9.CB7.hIDUA의 용량으로부터 비어 있는 캡시드가 제거되었음을 확인하기 위해, 비어 있는 캡시드를 본 명세서의 실시예 5에서 논의된 바와 같이 염화세슘 구배 초원심분리 또는 벡터 정제 과정 중에 이온 교환 크로마토그래피에 의해 벡터 입자로부터 분리한다.
- [0353] 벡터에 더하여 면역 억제 요법이 제공될 수 있다. 면역 억제 요법은 코르티코스테로이드(메틸프레드니솔론 -제2 일에 10 mg/kg 정맥내로 [IV] 1회 및 경구용 프레드니손 -제1 일에 0.5 mg/kg/day에서 시작하여 점점 줄어듦과 제16 주에 중단됨), 타크롤리무스(0.2 mg/kg/day 경구로 [PO] -제2 일 내지 제24 주), 및 시롤리무스(1일 1회 [QD] -제2 일에서 제48주 방문까지)를 포함한다. 예시의 시롤리무스 용량은 다음을 포함할 수 있다(6 mg PO -제2 일, 이어서 2 mg QD -제1 일부터 제48주 방문까지). 16-24 ng/mL 내에서 전혈 트로프 농도를 유지하도록 시롤리무스 용량 조절이 이루어질 수 있다. 더 짧은 기간 또는 더 긴 기간 동안 약물을 전달하는 것을 포함하여, 요법 중의 다른 약물에 대한 조절이 또한 이루어질 수 있다. 대부분의 대상체에서, 용량 조절은 다음 식을 기반으로 할 수 있다: 새로운 약물 = 현재 용량 $\times$ (표적 농도/현재 농도). 대상체는 농도 모니터링을 이용한 추가의 투약량 조절 전에 적어도 7-14일 동안 새로운 유지 용량으로 지속될 수 있다. 선택적으로, 환자는 정맥내 효소 대체 요법(ERT, 예를 들어, 알두라자임(등록상표)[라로나다제]), 뿐만 아니라 임의의 보완 수단(예를 들어, 물리치료)의 안정한 요법을 유지하도록 허용될 수 있다. 환자를 임의의 부작용에 대하여 관찰한다. 심각한 부작용은 환자를 임의의 부작용에 대해 모니터링한다. 심각한 부작용은 "하이의 법칙(Hy's Law)" 사건으로 칭해지는 ALT $\sim 3 \times$ ULN 및 빌리루빈 $\sim 2 \times$ ULN($>35\%$ 직접)으로서 나타내는 과빌리루빈혈증과 함께 가능한 약물-유도 간손상을 포함할 수 있다.
- [0354] 일부 실시형태에서, 면역 억제 요법 요법은 다음과 같다:
- [0355] 코르티코스테로이드
- [0356] 벡터 투여(제1 일 사전 투약) 날 아침에, 환자는 적어도 30분에 걸쳐 메틸프레드니솔론 10mg/kg IV(최대 500 mg)를 받는다. 메틸프레드니솔론은 요추 천자 및 rAAV9.CB7.hIDS의 척추강내(IC) 주사 전에 투여된다. 아세트아미노펜 및 항히스타민제의 예비 투약은 선택적이다.
- [0357] 제2 일에, 경구용 프레드니손은 제12 주까지 프레드니손을 중단할 목적으로 시작된다. 프레드니손의 용량은 다음과 같다:
- [0358] 제2 일 내지 제2 주 끝: 0.5 mg/kg/day. 제3 주 및 제4 주: 0.35 mg/kg/day. 제5 주 내지 제8 주: 0.2 mg/kg/day. 제9 주 내지 제12 주: 0.1 mg/kg.
- [0359] 프레드니손은 제12 주 이후에 중단된다. 프레드니손의 정확한 용량은 그 다음의 더 높은 임상으로 실용적인 용량으로 조절될 수 있다.
- [0360] 시롤리무스: 벡터 투여 전 2일(-제2 일): 4시간 마다 $\times$ 3회 용량의 시롤리무스 1 mg/m^2 의 장입 용량이 투여된다. -제1 일부터: 시롤리무스 $0.5 \text{ mg/m}^2/\text{day}$ 를 1일 2회로 나누어 4-8 ng/ml의 표적 혈액 수준으로 투약. 시롤리무스는 제48 주 방문 이후 중단된다.
- [0361] 타크롤리무스: 타크롤리무스는 제2 일(rAAV9.CB7.hIDUA 투여 다음 날)에 1일 2회 1 mg 의 용량으로 시작되고 24 주 동안 4-8 ng/mL의 혈액 수준을 달성하도록 조절된다. 제24 주 방문에 시작하여, 타크롤리무스는 8주에 걸쳐 줄어든다. 제24 주에 용량은 대략 50%까지 감소된다. 제28 주에 용량은 대략 50%까지 더 감소된다. 타크롤리무스는 제32 주에 중단된다.
- [0362] 다른 실시형태에서, 3세 미만의 환자에 대한 면역 억제 요법은 다음과 같다:
- [0363] 코르티코스테로이드
- [0364] · 벡터 투여(제1 일 사전 투약) 아침에, 환자는 적어도 30분에 걸쳐 메틸프레드니솔론 10mg/kg IV(최대 500 mg)를 받을 것이다. 메틸프레드니솔론은 요추 천자 및 AAV9.hIDUA의 IC 주사 전에 투여되어야 한다. 아세트아미

노펜 및 항히스타민제로의 예비 투약은 조사관의 재량에 따라 선택적이다.

- [0365] · 제2 일에, 경구용 프레드니손은 제12 주까지 프레드니손을 중단할 목적으로 시작될 것이다. 프레드니손의 용량은 다음과 같다:
- [0366] ° 제2 일 내지 제2 주 끝: 0.5 mg/kg/day
- [0367] ° 제3 주 및 제4 주: 0.35 mg/kg/day
- [0368] ° 제5 주 내지 제8 주: 0.2 mg/kg/day
- [0369] ° 제9 주 내지 제12 주: 0.1 mg/kg
- [0370] ° 프레드니손은 제12 주 이후에 중단될 것이다. 프레드니손의 정확한 용량은 그 다음의 더 높은 임상으로 실용적인 용량으로 조절될 수 있다.
- [0371] 시롤리무스
- [0372] · 백터 투여 전 2일(-제2 일): 4시간 마다 x 3회 용량의 시롤리무스 1 mg/m²의 장입 용량이 투여될 것이다.
- [0373] · -제1 일: 시롤리무스 0.5 mg/m²/day 1-3 ng/ml의 표적 혈액 수준으로 1일 2회 나누어서 투약
- [0374] · 시롤리무스는 제48 주 방문 이후 중단될 것이다.
- [0375] 타크롤리무스
- [0376] · 타크롤리무스는 타크롤리무스는 제2 일(AAV9.hIDUA 투여 다음 날)에 1일 2회 0.05mg/kg의 용량으로 시작되고 24주 동안 2-4 ng/mL의 혈액 수준을 달성하도록 조절된다.
- [0377] · 제24 주 방문에 시작하여, 타크롤리무스는 8주에 걸쳐 줄어든다. 제24 주에 용량은 대략 50%까지 감소된다. 제28 주에 용량은 대략 50%까지 더 감소된다. 타크롤리무스는 제32 주에 중단된다.
- [0378] · 타크롤리무스 및 시롤리무스 혈액 수준 모니터링
- [0379] C. 환자 하위집단
- [0380] 적합한 환자는 하기를 포함할 수 있다:
- [0381] 혈장, 섬유아세포 또는 백혈구에서 측정하여 효소 활성화에 의해 확인되는 MPS I의 진단이 기록된 환자.
- [0382] 임의의 다른 신경학적 또는 정신 의학적 인자에 의해 설명할 수 없다면, 다음 중 하나로서 나타내는 MPS I에 기인하는 초기 신경인자 결함의 증거(의학적 기록)가 기록된 환자:
- [0383] IQ 검사 상에서 또는 신경심리학적 기능(언어 이해, 기억력, 주의력 또는
- [0384] 지각추론)의 1 영역에 대해 평균 미만의 2:1 표준 편차 스코어.
- [0385] 순차적 시험 상에서 1 초과 표준 편차 쇠퇴의 기록된 이력상의 증거(의학적 기록).
- [0386] 도움을 받아서 또는 도움 없이 필요한 프로토콜 검사를 완료하고, 적용 가능하다면, 검사일에 도움을 받아서 기여에 따르는 충분한 청각 및 시력을 가짐.
- [0387] 선택적으로, 적어도 6개월 동안 ERT(즉, 알두라자임(등록상표) [라로니다제] IV)의 안정한 요법 중에 있었다.
- [0388] 치료 전에, 환자를 선별하고 나서, 다음이 기준 중 하나 이상은 이 요법이 환자에 대해 적합하지 않다는 것을 나타낼 수 있다:
- [0389] · 다음 중 임의의 것을 포함하는 IC 주사에 대한 금기를 가짐:
- [0390] ° 기준 MRI 검사의 검토는 IC 주사에 대한 금기를 나타냄.
- [0391] ° IC 주사에 대한 금기를 초래한 머리/목 수술의 이력.
- [0392] ° CT(또는 조영제) 또는 일반적 마취에 대해 임의의 금기를 가짐.
- [0393] ° MRI(또는 가돌리늄)에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0394] ° 추정된 사구체 여과율(eGFR) <30mL/분/1.73m²을 가짐.

- [0395] · MPS I에 기인하지 않는 임의의 신경인지 결함 또는 신경 정신 의학적 병태의 진단을 가짐.
- [0396] · 시롤리무스, MMF 또는 프레드니솔론에 대한 과민성 반응의 임의의 이력을 가짐.
- [0397] · 면역억제 요법(예를 들어, 절대 호중구수 $<1.3 \times 10^3/\mu\text{L}$, 혈소판 수 $<100 \times 10^3/\mu\text{L}$ 및 헤모글로빈 $<12 \text{ g/dL}$ [남성] 또는 $<10 \text{ g/dL}$ [여성])에 적절하지 않은 임의의 조건을 가짐.
- [0398] · 요추 천자에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0399] · HSCT를 겪음.
- [0400] · 치료 전 6개월 내에 IT 투여를 통해 라로니다제를 받음.
- [0401] · 언제라도 IT 라로니다제를 받거나 환자를 과도한 위험에 두는 IT 투여와 관련되는 것으로 고려되는 상당한 부작용을 경험함.
- [0402] · 치료 전 적어도 3개월 동안 완전한 관해가 없었던 피부의 편평 세포 또는 기저 세포 암종 이외의 림프종의 임의의 이력 또는 다른 암의 이력.
- [0403] · 환자가 질베르 증후군의 이전에 알려진 이력 및 총 빌리루빈의 35% 미만의 집합 빌리루빈을 나타내는 분획화된 빌리루빈을 갖지 않는다면, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) $>3 \times$ 정상의 상한치(ULN) 또는 총 빌리루빈 $>1.5 \times$ ULN.
- [0404] · 인간 면역결핍 바이러스(HIV)-양성 검사의 이력, 활성 또는 재발 B형 또는 C형 간염의 이력 또는 B형 간염, C형 간염 또는 HIV에 대한 양성 선별 검사.
- [0405] · 임신 중, 산후 6주 미만, 모유 수유 또는 임신 계획 중(자기 또는 배우자)
- [0406] · 치료 전 1년 이내에 알코올 또는 약물 남용의 이력.
- [0407] · 환자 안전성을 위태롭게 하는 심각한 또는 불안정한 의학적 또는 정신적 병태를 가짐.
- [0408] · 제어되지 않는 발작.
- [0409] 적합한 환자는 하기 연령의 남성 또는 여성 대상체를 포함한다:
 - [0410] · 신생아;
 - [0411] · 3 내지 9개월;
 - [0412] · 4 개월 이상 내지 9개월 미만;
 - [0413] · 9개월 이상 내지 18개월 미만;
 - [0414] · 9 내지 36개월;
 - [0415] · 18개월 이상 내지 3세 미만;
 - [0416] · 3 내지 12세;
 - [0417] · 12+세
 - [0418] · 18+세
- [0419] 특정 실시형태에서, 적합한 환자는 3세 미만의 남성 또는 여성, 및 다음 중 하나 이상, 또는 모두를 포함한다:
 - [0420] 1) 대상체의 법적 보호자(들)는 연구의 성격이 설명된 이후, 및 임의의 연구-관련 절차 이전에 서면으로 된 서명된 사전 동의서를 기꺼이 제공할 수 있다.
 - [0421] 2) 중증 MPS I-혈리의 기록된 진단을 가짐:
 - [0422] a) MPS I-H와 적합한 임상 징후 및 증상의 존재, 및/또는
 - [0423] b) 중증 표현형과 배타적으로 관련된 돌연변이에 대한 동형 접합성 또는 화합물 이형 접합성.
 - [0424] 3) 55 이상의 지능지수(IQ)를 가짐.
 - [0425] 4) 도움을 받아서 또는 도움 없이 필요한 프로토콜 검사를 완료하고, 적용 가능하다면, 검사일에 도움을 받아서

기꺼이 따르는 충분한 청각 및 시력을 가짐.

- [0426] 특정 실시형태에서, 다음 제외 기준 중 어느 것을 충족시키는 대상체의 치료는 치료에 부적합하다:
- [0427] 5) 다음 중 임의의 것을 포함하는 IC 주사에 대한 금기를 가짐:
- [0428] a) 신경방사선학자/신경외과 의사의 중재위원회에 의한 기준 자기 공명 영상화(MRI) 검사의 검토는 IC 주사에 대한 금기를 나타냄.
- [0429] b) 신경방사선학자/신경외과 의사의 중재위원회에 의한 입수 가능한 정보의 검토에 기반하여, IC 주사에 대한 금기를 초래한 머리/목 수술의 이력.
- [0430] c) 컴퓨터 단층촬영(CT)(또는 조영제) 또는 일반적 마취에 대해 임의의 금기를 가짐.
- [0431] d) MRI(또는 가돌리늄)에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0432] e) 추정된 사구체 여과율(eGFR) <30mL/분/1.73m²을 가짐.
- [0433] 6) MPS I에 기인하지 않는 임의의 신경인지 결함 또는 의사의 주장에 따라 연구 결과의 해석이 틀렸음을 증명할 수 있는 신경 정신 의학적 병태의 진단을 가짐.
- [0434] 7) 요추 천자에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0435] 8) 조혈모세포 이식(HSCT)을 겪음.
- [0436] 9) AAV-기반 유전자 요법 산물을 이용한 전처리를 받음.
- [0437] 10) 언제라도 척추강내(IT) 라로니다제를 받거나 의사의 주장에 따라 환자를 과도한 위험에 두는 IT 투여와 관련된 것으로 고려되는 상당한 AE를 경험함.
- [0438] 11) 림프종의 임의의 이력 또는 선별 전 적어도 3개월 동안 완전한 관해가 없었던 피부의 편평 세포 또는 기저 세포 암종 이외의 다른 암의 이력.
- [0439] 12) 최대 의학적 치료에도 제어되지 않는 고혈압(수축기 혈압 [BP] >180 mmHg, 확장기 BP >100 mmHg).
- [0440] 13) 마이크로리터(μ L) 당 혈소판 수 <100,000을 가짐
- [0441] 14) 환자가 질베르 증후군의 이전에 알려진 이력을 갖지 않는다면, 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) >3 x 정상 상한치(ULN) 또는 총 빌리루빈 >1.5 x ULN을 가짐.
- [0442] 15) 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 또는 B형 또는 C형 간염 바이러스 감염의 이력, 또는 B형 간염 표면 항원 또는 B형 간염 코어 항체, 또는 C형 간염 또는 HIV 항체에 대한 양성 선별 검사.
- [0443] 16) 사전 동의 형식(ICF)에 서명하기 전 30일 또는 5회 반감기 중 더 긴 기간 이내에 임의의 시험용 제품을 받음.
- [0444] 17) 임상 현장 직원 또는 연구 수행에 수반되는 임의의 다른 개인의 1급 가족 구성원이거나, 또는 임상 현장 직원 또는 연구 수행에 수반되는 임의의 다른 개인.
- [0445] 18) PI의 주장에 따라 대상체의 안전을 손상시키는 임상적으로 유의한 ECG 이상을 가짐.
- [0446] 19) PI의 주장에 따라 대상체의 안전 또는 연구에 성공적인 참여 또는 연구 결과의 해석을 손상시키는 심각하거나 불안정한 의학적 또는 심리학적 병태를 가짐.
- [0447] 20) 현장 신경방사선학자/신경외과 의사의 주장에 따라 그리고 의료용 모니터를 이용한 논의시, 대상체의 투여 및 적절한 주입에 영향을 미칠 수 있는 (대뇌) 뇌실측로술을 받음.
- [0448] 면역 억제 요법과 관련된 제외 기준:
- [0449] 21) 타크롤리무스, 시롤리무스, 또는 프레드니손에 대한 과민성 반응의 이력;
- [0450] 22) 원발성 면역결핍증(예를 들어, 보편적인 가변적 면역결핍 증후군), 비장 절제, 또는 대상체를 감염에 취약하게 만드는 임의의 근본적인 병태의 이력.
- [0451] 23) 선별 전 적어도 12주에 완전히 해결되지 않은 대상포진, 시토메갈로바이러스, 또는 엡스타인 바 바이러스(EBV) 감염.

- [0452] 24) 방문 2 전에 적어도 8주에 해결되지 않은 입원 또는 비경구 항감염제로의 치료가 필요한 임의의 감염.
- [0453] 25) 방문 2 전 10일 내에 경구용 항감염제(항바이러스제 포함)를 필요로 하는 임의의 활성 감염.
- [0454] 26) 선별 동안 활성 결핵(TB) 또는 양성 칸티페론-TB 금 검사의 이력.
- [0455] 27) ICF에 서명하기 전 8주 이내에 임의의 살아있는 백신.
- [0456] 28) ICF에 서명하기 전 8주 이내에 큰 수술 또는 연구 기간 동안에 계획된 큰 수술.
- [0457] 29) 등록 6개월 이내에 아테노이드 절제술 또는 편도선 절제술에 대한 필요 예상. 아테노이드 절제술 또는 편도선 절제술이 예상되면, 선별 전에 수행되어야 한다.
- [0458] 30) 절대 호중구 수 $<1.3 \times 10^3/\mu\text{L}$.
- [0459] 31) 임상가가 면역 억제 요법에 적절하지 않다고 믿는 임의의 병태 또는 실험실 이상.
- [0460] D. 임상 목적의 측정
- [0461] 1차 임상 목적은 MPSI 결함과 관련된 신경인지 쇠퇴를 방지하고 및/또는 선택적으로 반전시키고 및/또는 신경발달 쇠퇴를 늦추거나 정지시키는 것을 포함한다. 임상 목적은, 예를 들어, 혈터 대상체에 대한 베일리 영아 및 유아 발달 척도, 3판(Bayley Scale of Infant and Toddler Development, Third Edition: Bayley-III) 및/또는 웨슬러 유아 지능 검사, 4판(Wechsler Preschool and Primary Scales of Intelligence, Fourth Edition: WPPSI-IV)에 의해 측정하여 또는 혈터-샤이에 대상체에 대한 WASI에 의해 측정하여 지능지수(IQ)를 측정함으로써 결정된다. 신경인지 발달 및 기능의 다른 적절한 측정은, 예를 들어, 베일리 영아 발달검사(BSID-III)를 이용하는 발달지수(DQ) 평가, 홉킨스 언어 학습 검사를 이용하고 및/또는 WASI-I and/or Bayley-III, 및/또는 주의력 검사(TOVA)를 이용하는 기억 평가가 이용된다.
- [0462] 2차 종말점은 바이오마커 및 임상 결과의 평가를 포함한다. 소변은 총 글리코사미노글리칸(들)(GAG) 함량뿐만 아니라 MPS I 특이적 pGAG에 대해 평가된다. 혈청은 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, pGAG 및 헤파린 조인자 II-트롬빈 복합체의 농도에 대해 평가된다. 동물 데이터는 전신 효과가 존재할 수 있다는 것을 나타내기 때문에, 혈장 dI 바이오마커(GAG 및 IDUA)에 대하여 모니터링된다. CSF는 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, 헥소사미니다제(hex) 활성, 및 pGAG에 대해 평가된다. 백터(예를 들어, AAV9)에 대한 중화 항체 및 IDUA에 대한 결합 항체의 존재는 CSF 및 혈청에서 평가될 수 있고, 백터 캡시드(예를 들어, AAV9)에 대한 T 세포 반응은 ELISPOT 분석에 의해 평가될 수 있으며, 그리고 CSF, 혈청 및 소변뿐만 아니라 백터 농도(AAV9 DNA에 대해 정량적 PCR(qPCR))에서 IDUA 발현의 약동학이 또한 모니터링될 수 있다. CSF, 혈장 및 소변에서 백터 웨딩이 모니터링될 수 있다.
- [0463] 탐구 종말점은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 면역원성, 예를 들어, CSF 및 혈청에서 AAV9에 대한 중화 항체 및 IDUA에 대한 결합 항체 측정, 효소-관련 면역점(ELISPOT) 분석: AAV9 및 IDUA에 대한 T-세포 반응, 및 유동 세포 분석법: AAV- 및 IDUA- 특이적 조절 T 세포. 다른 탐구 종말점은 뇌의 자기 공명 영상화(MRI)에 의해 평가된 CNS 구조 이상; 복부 초음파에 의해 평가된 간 및 비장 용적; 청각 뇌간 반응(ABR) 검사에 의해 측정된 청력 변화; 혈장(GAG 및 IDUA), CSF(GAG, IDUA 및 스퍼민), 및 소변(GAG)에서의 바이오마커; 바이러스 웨딩: CSF, 혈청, 및 소변에서 백터 농도(AAV9.hIDUA 데옥시리보핵산[DNA]에 대한 정량적 폴리머라제 연쇄 반응[qPCR]); 질환의 전신 징후에 대한 효과(CSF와 비교하여) 및 삶의 질을 포함할 수 있다.
- [0464] 실시예 2: 신생아 전신 AAV는 MPS I 개 및 비인간 영장류에서 CNS 유전자 요법에 대한 관용을 유도한다
- [0465] 본 실시예는 개와 비인간 영장류 둘 다에서, 신생아에서의 아테노 연관 바이러스(AAV) 백터를 이용하는 간 관련 유전자 전달이 이식유전자에 대한 면역학적 관용의 지속적 상태를 유도하고, 중추 신경계(CNS)를 표적화하는 후속적 백터 투여의 효능을 실질적으로 개선시킨다는 것을 입증한다. 이 접근은 효소 α -1-이두로니다제(IDUA)의 결함 활성화에 기인하는 진행성 CNS 질환을 특징으로 하는 라이소좀 저장 질환인 I형 점액다당류증(MPS I)의 개 모델에 적용된다. 1개월령 MPS I 개에서 척추강내 AAV 전달을 이용하는 CNS 표적화된 유전자 전달은 뇌 병변에서의 개선을 부분적으로 약화시키는 개 IDUA의 항체 유도를 초래하였다. 개 IDUA를 발현시키는 백터로 생후 첫 주에 전신으로 치료된 MPS I 개는 효소에 대해 항체를 발생시키지 않았고 1개월령에 척추강내 AAV 전달 시 CNS에서 강한 발현을 나타내어, 뇌 저장 병변의 완전한 교정을 초래한다. 인간 IDUA를 발현시키는 AAV 백터로 전신으로 치료한 신생아 레서스 원숭이는 마찬가지로 이식유전자에 대해 관용이 발생되었고, 이는 극적으로 더 높은 CSF IDUA 발현 및 후속적 CNS 유전자 요법의 항체 유도의 부재를 초래하였다. 이들 발견은 면역 발생에서 중요한 기간 동안 이식유전자에 대해 관용을 유도함으로써 유전자 요법의 효능 및 안전성을 개선시키는 확률을 시사

한다.

[0466] A. 물질 및 방법

[0467] 1. 벡터 생성

[0468] 시험 항목은 닭 베타 액틴 프로모터(CB7), 키메라 인트론(CI), 코돈-최적화된 개 IDUA 이식유전자(cIDUA) 및 폴리아데닐화 신호(RBG)로 이루어진 발현 작제물을 패키징하는 AAV9 캡시드로 이루어졌다. 발현 작제물은 AAV 혈청형 2 반전 말단 반복부에 측접된다. 이 벡터는 AAV2/9.CB7.CI.cIDUA.RBG 또는 AAV9.CB7.CI.cIDUA.RBG 중 하나로서 표기한다. 일부 동물을 개 IDUA 단백질에 대한 관용을 유도하기 위해 상이한 벡터를 이용하여 신생아로서 정맥내로 치료하였다. 이 벡터는 간 특이적 갑상선 호르몬 결합 글로불린 프로모터(TBG), 인공 인트론(PI), 코돈-최적화된 개 IDUA 이식유전자(cIDUA) 및 폴리아데닐화 신호(RBG)로 이루어진 발현 작제물 상의 AAV8 캡시드로 이루어졌다. 발현 작제물은 AAV 혈청형 2 반전 말단 반복부에 측접된다. 293 세포의 삼중 형질감염에 의해 벡터를 생성하고 나서, 앞서 기재한 바와 같이 이오딧사물 구매 상에서 정제하였다[L Wang et al, Human gene therapy 22, 1389-1401 (2011); 온라인 공개 EpubNov].

[0469] 2. 동물

[0470] MPS I 개 콜로니를 연구에서 동물의 관리 및 사용을 위한 NIH 및 USDA 가이드라인 하에 펜실베이니아 유니버시티 수의학과에서 유지하였다. 모든 MPS I 개 연구 프로토콜을 펜실베이니아 유니버시티 실험 동물 운영 위원회에 의해 승인받았다. 신생아 MPS I 개에서의 벡터 주사를 위해, AAV8 벡터를 0.5 내지 1mL의 멸균 식염수 중에 희석시키고 나서, 경정맥을 통해 주사하였다. 앞서 기재한 바와 같은 후두골 접근을 통해 AAV9 벡터 및 CSF 수집의 척추강내 주사를 수행하였다[C. Hinderer, et al, Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology in a Feline Model of Mucopolysaccharidosis I. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy, (2014); 온라인 공개 EpubJul 16]. 총 9마리의 MPS I 개를 이 연구에 포함시켰다. PCR 및 혈청 효소 분석에 의해 출생 시 유전자형을 확인하였다. 6마리의 개에 생후 첫날(N=3) 또는 제7일(N=3) 중 하나에 AAV 혈청형 8 벡터(5×10^{12} 개 게놈 복제물/킬로그램[GC/kg] 체중)의 IV 주사를 투여하였다. 한 마리의 동물이 생후 3일에 죽었다. 남아있는 5마리의 처리 동물뿐만 아니라 3마리의 미경험 MPS I 개를 1개월령에 척추강내 AAV9(10^{12} GC/kg)로 처리하였다. 수명의 처음 7주동안 매주, 그 다음에 이후 매달 말초 혈관으로부터 혈액을 수집하였다. 척추강내 벡터 주사 시(1개월령), 주사 후 제7일 및 제21일 및 이후에 매달 CSF(1mL)를 수집하였다. 펜토바르비탈나트륨의 투여(80mg/kg IV)에 의해 안락사를 수행하였다. 9개월령에 5마리 동물을 안락사시키고 나서; 11개월령에 안락사시켰다. 비처리 MPS I 및 대조군을 6 내지 26개월령에 안락사시켰다. 조직을 수집하고 나서, 앞서 기재한 바와 같이 처리하였다[Hinderer et al, 2014].

[0471] 동물 복지 및 프로토콜의 필요에 따른 모든 동물 절차는 캘리포니아 유니버시티 데이비스 캠퍼스의 실험 동물 운영 위원회에 의해 실행 전에 승인되었다. 동물 관리와 관련된 활동을 캘리포니아 국립 영장류 연구 센터 표준 작업 절차(California National Primate Research Center standard operating procedures)에 따라 수행하였다. 이전의 임신 이력이 있는 정상적으로는 순환성의, 성체 암컷 레서스 원숭이(마마카 몰라타(*Macaca mulatta*); N=4)를 사육하고, 확립된 방법을 이용하여 임신한 것으로 확인하였다[AF Tarantal, in The Laboratory Primate. (2005), pp. 317-352]. 연구를 위해 선택한 모든 어미를 사전 선별하여 그들이 AAV 항체에 대해 혈청 음성이라는 것을 보장하였다. 정상 성장 및 발달을 확인하기 위해 임신 동안 초음파로 태아를 모니터링하고[AF Tarantal (2005)] 확립된 프로토콜에 따라 기간이 끝나고(임신 160 ± 2 일) 제왕절개에 의해 신생아를 분만시켰다 [A. F. Tarantal, et al, Mol Ther 12, 87-98 (2005); 온라인 공개 EpubJul]. 분만 후에 신생아를 인큐베이터에 넣고, 연구를 위해 육아실에서 길렀다. 영아 건강상태, 음식 섭취 및 체중을 확립된 프로토콜에 따라 육아실에서(연령에 따라) 매일 또는 매주 기록하였다. 출생 시 모든 동물에 선택된 AAV 벡터 IV를 투여하였다. 생후 1개월에 그리고 후속적인 매달의 시점에(전달 후 2개월까지, 지금까지) 영아는 CSF의 수집을 위해(대략 0.5mL; 사전 주사 다음에 매주 또는 매달) 그리고 후두골 접근을 통한 척추강내 주사를 위해(대략 0.5mL 용적; 1개월 및 CSF의 수집 직후) 제체 내 케타민(10mg/kg 근육내로, IM) 및 텍스메토미딘(0.015 내지 0.075mg/kg IM)으로(모두 멸균 조건 하에서) 진정 시켰다. 혈액 샘플을 출생 시, 이어서, 매달 말초 혈관(대략 3 내지 6mL)으로부터 수집하여 CBC 및 임상 화학 패널을 모니터링하고, 혈청 및 혈장의 수집을 위해 모니터링하였다. 샘플 수집이 완료되었을 때 텍스메토미딘과 비슷한 용량으로 반전 아티파메졸을 IM으로 제공하였다.

[0472] 기재한 바와 같이 택맨 PCR에 의해 정량화한 조직 및 벡터 게놈으로부터 DNA를 단리시켰다[L Wang, 2011]. IDUA 및 Hex 활성에 대한 분석을 [Hinderer et al, 2014]에 기재한 바와 같이 수행하였다.

- [0473] 앞서 기재된 방법을 이용하여 샌디에이고에 소재한 캘리포니아 유니버시티에서 당쇄공학 코어에 의해 CSF pGAG 측정을 수행하였다[R. Lawrence, et al, Nature chemical biology 8, 197-204 (2012); 온라인 공개 EpubFeb]. 간략하게, CSF 샘플로부터 GAG를 추출하고 나서, 헤파리나제 I, II 및 III을 이용하여 이당류로 분해시켰다. 환원성 결합에 의해 아닐린 ¹²C로 이당류를 태그하고 나서, 스피드 백(speed vac)에 의해 건조시켰다. LC-MS 등급 수 중에서 건조 샘플을 재구성하고 나서, 공지된 농도의 ¹²C-아닐린 태그 표준을 첨가하였다. 써모 사이언티픽 얼티메이트 3000(Thermo Scientific Ultimate 3000) HPLC 시스템을 구비한 LTQ 오비트랩 디스커버리(Orbitrap Discovery) 전기분무 이온화 질량분석기(Thermo Scientific) 상에서 샘플을 분석하였다.
- [0474] 발현 작제물이 갑상선 호르몬 결합 글로블린 프로모터의 제어 하에 개 cDNA를 함유하고, cIDUA 단백질이 Huh7 세포에서 생성된다는 것을 제외하고, 개 IDUA에 대한 항체에 대한 ELISA를 [Hinderer et al, 2014]에 기재한 바와 같이 수행하였다. 사용한 검출 항체는 HRP-접합 양 항-개(일리노이주 락포드에 소재한 피어스(Pierce))였다. 알두라자임(매사추세츠주 캠프릿지에 소재한 젠자임(Genzyme)) 10 µg/mL을 코팅 항원에 대해 사용하고 검출 항체가 다클론성 염소 항-인간(펜실베이니아 웨스트 그루브에 소재한 잭슨 면역노리서치 래버러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories))이라는 것을 제외하고 레서스 원숭이에서 인간 IDUA에 대한 항체에 대한 분석은 동일하였다.
- [0475] 모노시알로디헥소실갱글리오사이드(GM3), 콜레스테롤, 및 라이소좀 막 단백질(LIMP2) 저장에 대해 양성인 뉴런을 정량화하기 위해 다음의 변형에 의해 앞서 기재한 바와 같이 MPS I 개 뇌의 조직학적 분석을 수행하였다[C. Hinderer, 2014]: I층(분자층)과 II층 사이의 경계선이 영상의 상부 경계선을 형성하도록 10x 대물렌즈를 이용하여 대뇌 피질의 LIMP2- 및 필리핀-염색 절편의 영상을 촬영하였다. 각각의 동물로부터 총 10개 영상을 획득하였다. 뇌 분자층을 포함하는 대뇌 피질 바로 아래의 면적으로부터 4x 대물렌즈를 이용하여 GM3- 염색 뇌 절편의 영상을 촬영하였다. 각각의 동물로부터의 7개의 영상을 분석하였다. 앞서 기재한 바와 같이[M. Aldenboven et al, Biology of Blood and Marrow Transplantation 14, 485-498 (2008); 온라인 공개 EpubMay] "역치" 및 "입자 분석"을 이용하여 ImageJ 소프트웨어(Rasband W. S., 미국 국립 보건원, USA; rsb.info.nih.gov/ij/)를 이용하여 모든 영상을 처리하였다.
- [0476] B. 결과
- [0477] 1. MPS I 개에서 척추강내 AAV9-매개 유전자 전달 후 개 IDUA에 대한 항체 유도
- [0478] MPS I의 개 모델은 인간 질환의 다수의 징후를 정확히 개괄한다[E. Kakkis, et al, Molecular genetics and metabolism 83, 163-174 (2004); 온라인 공개 EpubSep-Oct; R. M. Shull, et al, Am J Pathol 114, 487-495 (1984)]. 이들 동물은 IDUA의 제1 인트론의 유지를 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이 때문에 검출 가능한 IDUA 활성을 갖지 않는다[K. Menon et al, (Genomics 14, 763-768 (1992))]. 이들 동물에서 검출 가능한 IDUA 발현의 부재를 고려하면, 이들 개체는 일반적으로 전장 IDUA를 생성하지 않는 대립유전자를 운반하여, 단백질에 대해 그들을 면역학적으로 미경험으로 남기기 때문에, 본 발명자들은 그들이 MPS I의 중증의 형태를 갖는 환자에서 생기는 척추강내 유전자 요법에 대한 면역 반응을 모델링하는 것을 예상하였다[N. J. Terlato, G. F. Cox, Can mucopolysaccharidosis type I disease severity be predicted based on a patient's genotype? 문헌의 종합적인 검토. Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics 5, 286-294 (2003); 온라인 공개 EpubJul-Aug]. MPS I 개의 뇌는 갱글리오사이드, 예컨대 뉴런에서의 GM3의 광범위한 저장뿐만 아니라 콜레스테롤 및 LIMP2를 포함하는 라이소좀 막 단백질의 비정상 축적을 포함하는 MPS I와 관련된 특징적 병리를 나타낸다[R. M. Shull, et al, Am J Pathol 114, 487-495 (1984)]. MPS I 개는 또한 뇌 척수막에서 글리코사미노글리칸(GAG)의 현저한 저장을 나타내어, 일부 MPS I 환자에서 척수 압박에 기여하는 과정인 상당한 뇌척수막 비후화를 초래한다[E. Kachur, et al, Neurosurgery 47, 223-228 (2000); published online EpubJul; A. Taccone, et al, Pediatric Radiology 23, 349-352 (1993); 온라인 공개 EpubSep; S. Vijay, J. E. Wraith, Clinical presentation and follow-up of patients with the attenuated phenotype of mucopolysaccharidosis type I. Acta Paediatrica 94, 872-877 (2005)].
- [0479] 세(3)마리의 개를 아주 흔한 프로모터의 제어 하에 개 IDUA 서열을 운반하는 AAV9 벡터의 척추강내 주사에 의해 1개월령에 처음으로 치료하였다. 모든 동물에서 주사는 잘 용인되었고; 연구 내내 임상 징후는 관찰되지 않았다. CSF 분석은 일반적으로 현저하지 않았고, CSF 림프구의 단지 약간의 일시적인 상승이 2마리 동물에서 생겼다. 한 마리의 동물에서 단일 CSF 샘플은 주로 단핵구 세포로 이루어진 현저한 세포증다증을 나타내었다. 후속적 탭은 세포증다증의 증거를 나타내지 않았고, 그리고 안락사 시, 임의의 치료 동물의 뇌 또는 척수에서

염증의 조직학적 증거는 없었다.

[0480] 벡터는 CNS 내내 분포되어, 뇌 및 척수의 모든 분석된 영역에서 세포를 형질도입하였다. 모든 동물은 CSF에서 IDUA의 생리상향선(supraphysiologic) 발현을 나타내었는데, 이는 3개월의 과정에 걸쳐 한 마리 동물에서 정상 범위로 2마리 동물에서 정상 수준 미만으로 감소되었고, 이후에 동물을 안락사시킬 때까지 CSF 효소 수준은 5개월 동안 본질적으로 안정하였다. 임상 징후의 부재, 벡터 게놈 상실 또는 뇌염의 조직학적 증거는 indicated that CSF IDUA 활성의 감소가 세포독성 T 림프구에 의해 형질도입된 세포의 사멸에 기인하지 않는다는 것을 나타내며, 이는 또한 지속적인 잔여 CSF IDUA 활성화에 의해 뒷받침되었다. 대신, CSF IDUA 활성의 감소는 개 IDUA에 대한 고역가 항체의 유도과 관련되었다.

[0481] B. 신생아 유전자 전달에 의한 IDUA에 대한 관용 유도

[0482] 개 IDUA의 신생아 발현이 MPS I 개에서 효소에 대한 면역 관용을 유도할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, 6마리 동물을 출생 후 제1일(N=3) 또는 제7일(N=3)에 간 선택적 프로모터로부터 개 IDUA를 발현시키는 AAV 혈청형 8 벡터의 IV 주사로 치료하였다. 출생 후에 치료한 개 중 한 마리는 치료 후 2일에 죽었다. 신생아의 전반적인 생존은 비처리 MPS I 개에 대한 이력 데이터와 유사하였는데, 이는 대략 생후 처음 2주에 대략 20%의 사망률을 가진다[Vite, R. et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 15, 1423-1431 (2007); 온라인 공개 EpubAug]. MPS I 개에서 이런 초기 사망률의 원인은 결정되지 않았으며; 이런 치료 동물에서 부검은 MPS I의 전형적인 전신 병변뿐만 아니라 전신 박테리아 감염의 가능한 증거를 나타내었다. 치료 동물은 혈청 IDUA의 상승 다음에 빠른 감소를 입증하였다. 이는 신생아에서 간 유전자 전달을 위해 비-통합 벡터를 이용하는 이전의 연구에서 간세포 분할 동안의 벡터 게놈 상실에 기인하는 일실적 발현의 관찰과 일치된다[L. Wang, et al, 인간 유전자 요법 23, 533- 539 (2012); 온라인 공개 EpubMay].

[0483] 1개월령에, 출생 첫 번째 주에 IV AAV8을 받은 5마리의 살아있는 개에 척추강내 접근을 이용하여 AAV9 벡터의 주사를 제공하였다. 모두 5마리의 동물은 척추강내 벡터 주사 후 CSF에서 IDUA의 정상 수준의 30배 초과와 최대 수준을 나타내었고, 장기간 CSF 효소 수준은 미경험 동물에서 달성된 것보다 3- 내지 100-배 더 높았다. 개 IDUA에 대한 항체는 생후 1일에 치료한 개의 CSF에서 검출 불가능하였고, 생후 7일에 치료한 동물에서 검출 한계를 단지 약간 초과하였는데, 이는 그룹 둘 다에서 효소에 대한 면역 관용 상태를 시사한다.

[0484] 2. MPS I 개의 CNS에서 생화학적 그리고 조직학적 이상의 교정

[0485] 라이소좀 효소 헥소사미니다제(Hex)는 MPS I 동물의 조직에서 상향조절되고, 뇌 조직과 CSF 둘 다에서 상승된 Hex 활성은 IDUA 결핍증 하류에서 생기는 비정상 세포 과정에 대한 유용한 마커로서 작용한다[Hinderer et al (2014)]. 척추강내 벡터 전달 시(생후 대략 1개월) CSF Hex 활성의 측정은 모든 MPS I 개에서 비정상적으로 상승된 Hex 활성을 나타내었다. 척추강내 AAV9 단독으로 치료한 동물은 CSF Hex 활성에서 보통의 감소를 나타내었으며, 가장 높은 잔여 IDUA 발현을 갖는 동물만이 Hex 활성의 정상 범위에 도달되었다. 신생아 전신 유전자로 치료한 모두 5마리의 동물을 이동시킨 후에, 척추강내 벡터 투여는 CSF Hex의 완전한 정상화를 입증하였다. 뇌 조직 샘플에서 Hex 활성은, 가장 낮은 CSF IDUA 수준을 갖는 2마리의 척추강내-단독 치료 동물에서 효과가 약간 감소되었지만, 모든 치료 동물에서 뇌 Hex 활성의 실질적인 감소와 함께, 요법에 대해 CSF Hex보다 더 큰 반응을 나타내었다.

[0486] IDUA 결핍증에 기인하여 축적되는 병적 GAG(pGAG)의 비환원 말단에 특이적인 분석을 이용하여 CSF 내 GAG 농도를 측정하였다[R. Lawrence, et al; Nature chemical biology 8, 197-204 (2012); 온라인 공개 EpubFeb]. 모든 동물은 척추강내 AAV 주사 3주 후에 CSF pGAG 농도의 현저한 감소를 나타내었다. IDUA에 대해 면역 관용이 아닌 개가 면역관용 개보다 더 높은 잔여 CSF pGAG를 유지하였지만, 제112일에 이런 감소가 지속되었다. 조직학적 분석은 GM3, 콜레스테롤 및 LIMP2의 광범위 신경 축적과 함께 비처리 MPS I 개의 뇌 전체적으로 중증의 저장 병변을 나타내었다. 가장 높은 CSF IDUA를 갖는 동물만이 뉴런 저장의 완전한 해결을 경험하였지만, 척추강내 AAV9 단독으로 치료한 동물은 저장 병변의 실질적인 개선을 입증하였다. 다른 2마리의 척추강내-치료 개는 잔여 저장 병변을 가졌다. CNS 저장 병변은 신생아 AAV8 전신 유전자 전달 다음에 척추강내 AAV9 투여로 치료한 모두 5마리의 개에서 완전히 반전되었다. 뇌 실질 내 저장 병변에 추가로, 비처리 MPS I 개는 알시안 블루(Alcian blue) 염색에 의해 보이는 뇌척수막 내 GAG의 축적을 나타내었다. 이 뇌척수막 GAG 축적 및 뇌척수막의 얻어진 비후화는 수술적 개입이 필요한 척수 압박의 다수의 경우에 연루되며, 또한 CSF 재흡수의 정상 경로를 방해함으로써 일부 MPS I 환자에서 교통 수두증의 발생에 기여할 가능성이 있다. 모든 치료 동물은 뇌척수막 GAG 저장에서 개선의 증가를 나타내었다. 뇌척수막은 모든 관용 개 및 한 마리의 비관용 개에서 거의 완전히 정상으로 나타났지만, 가장 낮은 CSF IDUA 활성을 갖는 2마리의 비관용 동물은 일부 GAG 저장을 보유했다.

[0487] 3. 신생아 레서스 마카크에서 인간 IDUA에 대한 관용 유도

[0488] MPS I 개에서 관찰된 면역 관용 유도에 대한 신생아 창이 또한 영장류에서 발견될 수 있는지의 여부를 평가하기 위해, 신생아 레서스 원숭이(N=4)에서 유사한 연구를 수행하였다. 이들 동물은 IDUA 결여가 아니기 때문에, 활성 내인성 단백질이 없는 환자에서 중-특이적 이식 유전자에 대해 예상되어야 하는 면역 반응을 모델링하기 위해 인간 IDUA 이식유전자를 사용하였다. 2마리의 신생아 레서스 원숭이에 출생 시 간 특이적 프로모터 IV로부터 인간 IDUA를 발현시키는 AAV8 벡터를 투여하였다. 둘 다 혈청 IDUA 활성에서 잠깐의 증가를 입증하였다. 2마리의 추가적인 신생아에 출생 시 부적절한 이식유전자(인간 인자 IX) IV를 발현시키는 AAV8 벡터를 투여하였다. 모두 4마리의 동물에 척추강내 주사에 의해 생후 1개월에 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터를 투여하였다. MPS I 개와 유사하게, IDUA 미경험 동물은 주사 3주 후에 CSF IDUA 활성의 감소를 나타내었는데, 투여 후 2개월까지 기준 수준 근처로 복귀되었다. 이들 동물은 또한 CSF에서 이식유전자 특이적 항체가 발생되었다. 출생 시 IV로 IDUA 유전자 전달을 투여한 2마리의 동물은 CSF 중의 인간 IDUA에 대한 항체가 발생되지 않았고, 그리고 척추강내 AAV9 투여 2개월 후에 CSF 효소 활성을 10배 초과로 유지하였다. 모든 동물은 이력 대조군에 비교할 때, 역효과, 정상 성장 궤도, 및 온혈구계산(complete blood count: CBC) 및 연령을 기준으로 한 정상 한계 내의 화학적 패널의 증거가 없는 연구 기간 동안의 강함 및 건강함이 남아 있었다.

[0489] C. 논의

[0490] 야생형 치료 단백질에 대한 면역 활성화는 임의의 열성 질환에 대한 잠재적 우려이다. 단백질 대체 요법에 대한 항체 반응은 일부 LSD에 대해 특히 도전적이었는데, 항체가 정맥내로 전달된 효소의 분포 및 흡수를 방해할 수 있기 때문이다[E. J. Langereis, et al, Molecular genetics and metabolism, (2014); 온라인 공개 EpubOct 29]. 항체는 그들이 형질도입 세포로부터 분비된 효소에 의해 매개되는 교차-교정을 방해할 수 있기 때문에 이들 장애를 표적화하는 유전자 요법에 대해 동등하게 문제가 있을 수 있다.

[0491] 본 연구는 척추강내 AAV9 전달이 개에서 CNS 전체적으로 세포를 효과적으로 표적화할 수 있고 거대 동물의 뇌에서 MPS I와 관련된 생화학적 및 조직학적 이상을 교정하기 위한 충분한 발현을 달성한다는 것을 입증하였다. 벡터 생체내 분포 데이터는 뇌에서 세포 당 하나 미만의 벡터 게놈이 있다는 것을 나타내는데, 이는 관찰된 저장 병리에서의 광범위 감소가 분비된 효소에 의한 교차-교정에 기인하였다는 것을 나타낸다. 그러나, 척추강내 벡터 단독으로 치료한 3마리의 동물 중에서, 2마리는 CNS 저장 병변의 완전한 분해를 방지하기에 충분히 강한 항-이식유전자 항체 반응이 발생되었다. 이식유전자에 대한 항체 유도 후 정상 근처의 CSF IDUA 활성을 유지한 동물만이 CNS 유전자 요법에 대한 완전한 반응을 입증하였다. 이 결과로부터, CSF 중의 IDUA 활성은 척추강내 유전자 전달 후 효능의 합리적인 예측자이며, 대략의 정상 수준은 완전한 치료 이점이 필요하다는 결론을 내렸다. 이는 MPS I 고양이에서의 척추강내 유전자 요법에 의한 본 발명자들의 발견과 일치된다[Hinderer (2014)]. MPS I 고양이는 일반적으로 척추강내 유전자 전달에 대해 더 약한 항체 반응 및 MPS I 개보다 더 안정한 CSF IDUA 활성을 나타내었다. 이는 2개의 모델에서의 근본적인 돌연변이에 관한 것일 수 있는데, MPS I 고양이가 비활성 돌연변이체 IDUA를 발현시켜, 잠재적으로 그들을 효소에 대해 부분적으로 면역 관용으로 제공하기 때문이다. 중요하게는, MPS I 개에서의 본 데이터는 개를 좋아하는 중증의 질환을 갖는 MPS I 환자조차, 잔여 IDUA 발현, 즉, 척추강내 유전자 전달이 유해한 임상 사건을 초래하지 않은 후에 생길 가능성이 있는 항-이식유전자 항체 반응이 없으며, 항체 반응에도 불구하고 실질적인 효능이 남아있다는 것을 나타낸다. 그러나, 이들 데이터는 또한 CNS에서 IDUA에 대한 항체 반응을 방지하는 것이 MPS I에 대한 척추강내 유전자 요법의 효능을 개선시킬 수 있었다는 것을 시사한다.

[0492] 간-관련 유전자 전달을 이용하여, IDUA에 대한 초기 노출의 효과를 척추강내 유전자 요법 후 후속 면역 반응 상에서 시험하였다. 신생아 IDUA 발현은 1개월령에 척추강내 유전자 요법에 의해 달성된 CSF 효소 수준을 크게 증가시킨 MPS I 개에서의 효소에 대해 관용을 유도하였다. 면역관용 그룹에서 높은 CSF IDUA 수준은 지속적으로 신경병리학에서 완전한 반전을 초래하여, 간섭하는 항체 반응을 극복할 때 LSD에 대한 척추강내 유전자 요법에 의해 가능한 효능의 강한 예를 제공한다. 이식유전자에 대한 면역 관용의 유도를 위한 이런 신생아 창이 또한 비인간 영장류에서 존재한다는 발견은 임상으로의 전환을 위해 유망한 것으로 나타난다. 본 연구에 대한 몇몇 중요한 제한이 있다. 신생아 MPS I 새끼에서 척추강내 벡터 주사를 수행하는 것과 관련된 증가된 위험때문에, 신생아에서 CNS 관련 유전자 요법을 수행하기보다는 관용을 유도하는 수단으로서 전신 유전자 전달을 사용하였다.

[0493] 본 실시예에서 사용되는 접근은 척추강내 유전자 요법이 모든 실험군에서 동일한 방식으로 그리고 동일한 연령에서 수행되고, 상이한 연령의 동물에서의 형질도입 효율에서 차이의 혼재 효과 없이 동물 간의 CSF IDUA 수준

의 직접적인 비교를 허용한다는 이점을 가진다. 본 연구는 IDUA가 척추강내 백터 주사 시 이들 동물에서의 CSF에서 검출 가능하지 않았고, 그리고 CSF Hex 활성 및 pGAG 농도는 척추강내 유전자 전달 전에 교정의 증거를 나타내지 않았다는 것을 고려할 것 같지 않은 것으로 나타나지만, 본 연구는 또한 이전의 간 관련 유전자 요법이 면역관용 동물에서 뇌 병리의 개선된 교정에 기여할 가능성을 제외하지 않았다. 이는 극도로 높은 혈청 IDUA 활성이 뇌 병변에 대한 효과를 갖지 않는다는 MPS I 고양이에서의 선행연구와 일치된다[C. Hinderer, PNAS, 111: 14894-14899 (2014)]. 생후 7일에 치료된 MPS I 개에서 검출 가능한 항체 반응이 나타나기 시작했다는 관찰에 기반하여, 이 기간은 인간 연구에 대한 유용한 시작점으로서 작용할 수 있는 1주 내지 2주 이하로 지속된다는 것이 추정된다.

[0494] 인간 신생아가 개 및 비인간 영장류에서 본 명세서에서 입증된 이식유전자-특이적 면역 관용에 대해 동일한 잠재력을 나타내는 것으로 발견된다면, 신생아 유전자 전달은 면역 반응이 요법의 안전성 또는 효능을 제한하는 다수의 유전자 장애에 대해 엄청난 잠재력을 가질 수 있었다. 임상 시도를 실현 가능하게 하기 위해, 태아 또는 신생아 선별은 효과적이 될 이 접근에 대해 충분히 빨리 환자를 동정하는 데 필수적일 것이다. MPS I에 대해, 신생아 선별은 이제 몇몇 상태에서 실행되는데, 이는 인간 시험에서 처음으로 수행하는 잠재적 기회를 제공한다 [PV Hopkins et al, J Pediatr, (2014); 온라인 공개 EpubOct 18].

[0495] 실시예 3: 이식유전자-특이적 면역 관용의 유도는 개 질환 모델에서 인간 유전자 요법의 정확한 평가를 가능하게 한다

[0496] A. 물질 및 방법

[0497] 백터는 혈청형 9 발현 인간 이두로니다제(hIDUA)의 비복제성 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 백터이다. AAV9 혈청형은 IC 투여 후 CNS에서 hIDUA 산물의 효율적인 발현을 허용한다.

[0498] 1. 백터 생성:

[0499] AAV-hIDUA 백터 게놈 플라스미드 pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RBG(p3032)는 크기가 7,165bp이다. 이 플라스미드로부터 유래된 백터 게놈은 hIDUA 발현 카세트에 축적하는 AAV2 유래 ITR을 갖는 단일 가닥 DNA 게놈이다. 이식유전자 카세트로부터의 발현은 CB7 프로모터, CMV 급조기 인핸서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 사이의 혼성체에 의해 유도되는 한편, 이 프로모터로부터의 전사는 닭 베타 액틴 인트론(CI)의 존재에 의해 향상된다. 발현 카세트에 대한 폴리A 신호는 RBG 폴리A이다. hIDUA 서열을 코돈-최적화 및 합성함으로써 플라스미드를 구성하고, 얻어진 작제물은, 이어서, 플라스미드 pENN.AAV.CB7.CI.RBG(p1044), 즉, CB7, CI 및 RBG 발현 요소를 함유하는 AV2 ITR-축적 발현 카세트 내로 클로닝되어 pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RBG(p3032)를 제공한다.

[0500] 서열 요소의 설명

[0501] 반전 말단 반복부(ITR): AAV ITR(젠뱅크 # NC001401)는 양 말단 상에서 동일하지만 배향이 반대인 서열이다. AAV 및 아데노바이러스 헬퍼 기능이 도중에 제공될 때, AAV2 ITR 서열은 백터 DNA 복제 기점과 백터 게놈의 패키징 신호 둘 다로서 작용한다. 이렇게 해서, ITR 서열은 백터 게놈 복제 및 패키징에 필요한 시스 서열만을 나타낸다.

[0502] CMV 급조기 인핸서(382bp, C4; 젠뱅크 # K03104.1). 이 요소는 백터 게놈 플라스미드에 존재한다.

[0503] 닭 베타-액틴 프로모터(282 bp; CB; 젠뱅크 # X00182.1) 프로모터는 고수준의 hIDUA 발현을 유도하기 위해 사용된다.

[0504] 닭 베타-액틴 인트론: 닭 베타 액틴 유전자(젠뱅크 # X00182.1)로부터의 973bp 인트론은 백터 발현 카세트 내에 존재한다. 인트론은 전사되지만, 스플라이싱에 의해 성숙 전령 RNA(mRNA)로부터 제거되어, 그의 축적 중 하나에서 서열을 합친다. 발현 카세트 내 인트론의 존재는 핵으로부터 세포질까지 mRNA의 수송을 용이하게 하는 것으로 나타났고, 따라서 번역을 위해 mRNA의 정상 수준의 축적을 향상시킨다. 이는 증가된 수준의 유전자 발현에 대해 의도된 유전자 백터에서의 통상적인 특징이다. 이 요소는 백터 게놈 플라스미드 둘 다에 존재한다.

[0505] α-L-이두로니다제 암호 서열: hIDUA 서열(젠뱅크 NP_000194)은 코돈-최적화되고, 합성된다[서열번호 1]. 암호화된 단백질은 653개의 아미노산[서열번호2]이며 예측 분자량이 73 kD이고, 겔보기 분자량은 SDS PAGE에 의해 83 kD이다.

[0506] 폴리아데닐화 신호: 127 bp 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 신호(젠뱅크 # V00882.1)는 항체 mRNA의 효율적인 폴리아데닐화를 위한 시스 서열을 제공한다. 이 요소는 전사 종결, 초기 전사체의 3' 말단에서의 특정 절단 사

건 및 긴 폴리아데닐 꼬리의 첨가를 위한 신호로서 작용한다. 이 요소는 벡터 게놈 플라스미드 둘 다에 존재한다.

[0507] 반전 말단 반복부(ITR): AAV ITR(젠뱅크 # NC001401)는 양 말단 상에서 동일하지만 배향이 반대인 서열이다. AAV 및 아데노바이러스 헬퍼 기능이 도중에 제공될 때, AAV2 ITR 서열은 벡터 DNA 복제 기점과 벡터 게놈의 패키징 신호 둘 다로서 작용한다. 이렇게 해서, ITR 서열은 벡터 게놈 복제 및 패키징에 필요한 시스 서열만을 나타낸다.

[0508] 작제물은 AAV9 캡시드에서 패키징되고, 정제하고 나서, 문헌[M. Lock et al, Human Gene Ther, 21: 1259-1271 (2010)]에서 앞서 기재된 바와 같이 적정된다.

[0509] 2. 동물 절차:

[0510] MPS I 개 콜로니를 연구에서 동물의 관리 및 사용을 위한 NIH 및 USDA 가이드라인 하에 펜실베이니아 유니버시티 수의학과에서 유지하였다. 모든 연구 프로토콜을 펜실베이니아 유니버시티 실험 동물 운영 위원회에 의해 승인받았다. 재조합 인간 IDUA의 주입을 위해, 사용 직전에 라로니다제(젠자임(Genzyme))를 식염수 중에서 5배 희석시켰다. 2시간에 걸쳐 말초 정맥 카테터를 통해 주입을 수행하였다. 앞서 기재한 바와 같은 후두כול 접근을 통해 AAV9 벡터 및 CSF 수집의 척추강내 주사를 수행하였다[C. Hinderer, et al, (Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 22, 2018-2027 (2014))]. 펜토바르비탈나트륨의 투여(80mg/kg IV)에 의해 안락사를 수행하였다. 조직을 수집하고 나서, 앞서 기재한 바와 같이 처리하였다[Hinderer (2014)].

[0511] 3. 효소 분석: 조직 용해물 및 CSF에서 IDUA 및 Hex 활성을 앞서 기재한 바와 같이 측정하였다[C. Hinderer, et al, (Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 22, 2018-2027 (2014))].

[0512] 4. 항-hIDUA ELISA: 인산염 완충제 pH 5.8 중에서 5 µg/mL로 희석된 재조합 인간 IDUA(젠자임)를 이용하여 4도에서 폴리스타이렌 ELISA 플레이트를 밤새 코팅시켰다. 플레이트를 세척하고 나서, pH 5.8 인산염 완충제 중에서 2% BSA 중에서 차단하였다. PBS 중에서 1:50으로 희석시킨 CSF 샘플과 함께 실온에서 1시간 동안 플레이트를 인큐베이션시켰다. 플레이트를 세척하고 나서, 2% BSA가 있는 인산염 완충제 중에서 1:10,000으로 희석시킨 HRP 접합 항-개 IgG(일리노이주 락포드에 소재한 피어스(Pierce))를 이용하여 결합 항체를 검출하였다. 15분 동안 테트라메틸벤지딘을 이용하여 ELISA를 전개하고, 이어서, 2N 황산으로 중단시키고 나서, 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 연속 희석시킨 양성 샘플의 표준 곡선으로부터 역가를 계산하였다.

[0513] 5. 조직학, 생체내 분포 및 통계학: GM3, 콜레스테롤, 및 LIMP2 저장에 대해 양성인 뉴런을 정량화하기 위해 다음의 변형에 의해 앞서 기재한 바와 같이 뇌의 조직학적 분석을 수행하였다[C. Hinderer, 2014]: I층(분자층)과 II층 사이의 경계선이 영상의 상부 경계선을 형성하도록 10x 대물렌즈를 이용하여 대뇌 피질의 LIMP2- 및 필리핀-염색 절편의 영상을 촬영하였다. 각각의 동물로부터 총 10개 영상을 획득하였다. 뇌 분자층을 포함하는 대뇌 피질 바로 아래의 면적으로부터 4x 대물렌즈를 이용하여 GM3- 염색 뇌 절편의 영상을 촬영하였다. 각각의 동물로부터의 7개의 영상을 분석하였다. 앞서 기재한 바와 같이[M. Aldenboven et al, Biology of Blood and Marrow Transplantation 14, 485-498 (2008); 온라인 공개 EpubMay] "역치" 및 "입자 분석"을 이용하여 ImageJ 소프트웨어(Rasband W. S., 미국 국립 보건원, USA; rsb.info.nih.gov/ij/)를 이용하여 모든 영상을 처리하였다. 경부 뇌척수막의 두께의 정량화를 경부 척수의 H&E 염색 절편 상에서 측정하였다. 300 µm 간격으로 슬라이드마다 총 뇌척수막 두께를 15회 측정 하였다.

[0514] 벡터 생체내 분포를 다음과 같이 평가하였다. [L. L. Wang, et al, Impact of Pre-Existing Immunity on Gene Transfer to Nonhuman Primate Liver with Adeno- Associated Virus 8 Vectors. Human gene therapy 22, 1389-1401 (2011); 온라인 공개 EpubNov]에 기재한 바와 같이 택맨 PCR에 의해 정량화한 조직 및 벡터 게놈으로부터 DNA를 단리시켰다. 적절하다면 크러스칼-왈리스 검정 다음에 두 검정 또는 맨-휘트니 검정을 이용하여 데이터를 평가하였다. P < 0.05는 통계학적으로 유의한 것으로 고려하였다. 프리즘 6.0(그래프패드(GraphPad) 소프트웨어)를 이용하여 모든 통계학적 분석을 수행하였다.

[0515] B. 결과

[0516] 1. 인간 IDUA를 발현시키는 척추강내 AAV9는 MPS I 개에서 강한 이식유전자-특이적 면역을 유발한다

[0517] MPS I 개는 성숙 mRNA에서 제1 인트론의 포함을 초래하는 IDUA 돌연변이를 운반하여 즉시 정지 코돈을 생성한다. MPS I 개에서의 돌연변이는 검출 가능한 IDUA 활성을 획득하지 않는다[KP Menon, et al, Genomics, 14: 763-768 (1992); NJ Terlatto, et al, Genet Med, 5: 286-294 (2003); XX He, et al, Mol. Genet Metab,

67: 106-112 (1999)]. 라이소좀 IDUA 활성의 부재 하에서, 비분해 GAG는 세포에서 축적된다[GN Sando, et al Cell, 12: 619-627 (2011)]. 영향받은 조직에서 이런 1차 GAG 저장 물질은 알시안 블루 염색에 의해 조직학적으로 직접 검출할 수 있다[C. Hinderer, et al, Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. 22, 2018-2027 (2014); NJ Terloato et al (2003); R. M. Shull, et al, Am J Pathol 114, 487-95 (1984); R. M. Shull, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 12937-12941 (1994); L. A. Clarke, et al., Pediatrics 123, 229-40 (2009); N. M. Ellinwood, et al., Mol. Genet. Metab. 91, 239-250 (2007); M. E. Haskins, et al, Am. J. Pathol. 112, 27 (1983); A. Chen, et al, Apmis 119, 513-521 (2011)]. 1차 GAG 저장 병리에 추가로, 라이소좀의 GAG 축적은 세포 이상의 특징적 캐스케이드를 야기한다. 상향 조절된 GAG는 라이소좀 막 단백질, 예컨대 LIMP2에 대해 증가된 염색에 의해 조직학 상에서 보이는 라이소좀 팽창을 야기한다. 뉴런은 또한 물질의 2차 축적, 예컨대 강글리오사이드(예를 들어 GM3) 및 비에스터화된 콜레스테롤을 나타낸다. 라이소좀 저장은 또한 라이소좀 효소, 예컨대 헥소사미니다제(Hex)의 이상 과발현을 유도한다.

[0518] 3마리의 MPS I 개를 인간 IDUA를 발현시키는 임상 후보 AAV9 벡터의 대조 내로 단일 척추강내 주사에 의해 1개월령에 치료하였다. 벡터 용량은 10^{11} 개의 게놈 복제물/kg(GC/kg)(n = 2) 내지 10^{12} 개의 GC/kg(n = 1)의 범위에 있다. 절차는 모든 대상체에서 잘 용인된다. CSF에서 IDUA 활성은 벡터 투여 후 증가되어, 제7일까지 대조군의 활성을 초과하였다(도 2a, 미경험). 그러나, 벡터 투여후 제21일까지, CSF IDUA 수준은 기준으로 떨어졌고, CSF 항-hIDUA 항체 역가에서의 상승을 수반하였다(도 2a, 미경험). 제21일 CSF 샘플은 또한 모든 동물에서 림프구 세포증다증을 나타내었다(도 4a, 미경험). 이 코호트에서, 상승된 CSF 항체 및 세포 계수는 임상 징후 또는 다른 실험실 이상과 관련되지 않으며, 세포증다증은 자발적으로 해결되었다. 주사 6개월 후에 부검 시, 조직학적 평가는 뇌 또는 척수에서 병리의 증거를 나타내지 않았다. 벡터 생체내 분포는 광범위한 CNS 형질도입 및 벡터 게놈의 지속성을 입증하였다.

[0519] 뇌 헥소사미니다제 과발현은 용량 중 하나에서 정상화되지 않았지만, 비처리 MPS I 개에 비해 감소되었다(도 7). 조직학은 또한 용량 의존적으로 나타나지 않는 LIMP2 및 GM3 면역염색에 의해 뇌 저장 병변의 부분적 분해를 나타내었다.

[0520] 이들 개에서 관찰한 바람직한 안전성 프로파일에 기반하여, 2마리의 추가적인 MPS I 개를 10배 더 고용량의 벡터(10^{13} 개의 GC/kg)로 치료하였다. 이들 개는 더 낮은 2회의 용량으로 치료된 동물과 유사한 역학으로 CSF 세포증다증이 발생되었지만(도 4a, 미경험); 그러나, 이들 두 대상체에서, 반응은 더 확연하였고, 세포증다증은 신경학적 징후의 개시와 일시적으로 관련된다. 벡터 투여 후 21일에 시작해서, 동물은 반사저하 및 뒷다리의 쇠약, 및 경부의 구부름 시 통증을 나타내었다. 통증 및 CSF 세포증다증은 진통제 및 코르티코스테로이드에 의한 치료 후 해결되기 시작했지만; 그러나, 뒷다리 쇠약은 지속되었고, 증상 개시 2주 후에 동물을 안락사시켰다. 조직병리학은 특히 요수에서 척수 운동 뉴런의 강한 형질도입을 입증하였고, 림프구는 형질도입 뉴런 주위를 침윤한다. 뇌 및 척수 전체적으로 절편의 전신 평가는 때때로 침윤물이 뇌에서 관찰되지만, 병리가 요수에 주로 국소화된다는 것을 확인하였다.

[0521] 2. 간 유전자 전달을 통한 인간 IDUA에 대한 신생아 노출은 후속적 척추강내 유전자 전달에 대한 관용을 유도한다

[0522] 이식유전자에 대한 지나친 면역 반응의 부재 하에서 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터를 평가하기 위해, 본 발명자들은 신생아 노출을 통한 인간 단백질에 대한 면역학적 관용을 유도하는 시도를 하였다. 생후 5일에, 6마리의 MPS I 개를 간 특이적 프로모터로부터 인간 IDUA를 발현시키는 AAV 혈청형 8 벡터(AAV8)의 단일 정맥내 주사로 치료하였다. 1개월령에 동물을 다음과 같은 3개의 코호트(n = 2 동물/코호트)에서 인간 IDUA를 발현시키는 상이한 용량의 AAV9 벡터의 대조 내로 척추강내 주사에 의해 치료하였다: 10^{10} , 10^{11} 및 10^{12} 개의 GC/kg. 모든 동물은 비 관용 개와 유사한 CSF IDUA 활성에서의 용량-의존적 상승을 나타내었지만(도 2a); 그러나, 이 코호트에서 CSF 효소 발현은 제21일 이후로 지속되었고, 실험의 지속기간 동안 검출 가능하게 남아있었다(도 2b, 관용 유도됨). CSF 항체 반응은 미경험(즉, 비 관용 유도) 동물에 척추강내 벡터를 투약할 때 관찰된 것에 비해 둔화되었으며; 관용 유도 코호트(I-602 및 I-606)에서 2마리의 동물만이 검출 가능한 역가를 나타내었고, 동등한 벡터 용량으로 치료한 미경험 동물보다 대략 20배 더 낮았다(도 3). 미경험 동물에서의 더 낮은 수준에도 불구하고, 이 코호트(I-606)에서 가장 높은 항체를 갖는 개만이 제21일에 상승된 CSF 림프구를 나타내었다(도 4a 및 도 4b). 이들 코호트에서 임상 부작용은 없었다.

[0523] 3. 척추강내 AAV9-매개 hIDUA 발현은 뇌 생화학적 이상 및 저장 병변의 용량-의존적 교정을 달성한다

- [0524] 신생아 유전자 전달을 통해 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 6마리의 MPS I 개를 척추강내 AAV9 주사 6개월 후에 희생시켰다. 뇌 용해물은 가장 높은 벡터 용량에서 가장 낮은 용량에서 부분적 교정과 함께 헥소사미니다제 활성의 완전한 정상화를 입증하였다(도 5). 헥소사미니다제 활성은 모든 벡터 용량에서 CSF에서 정상화되었다(도 8). MPS I 환자에서 척수 압박에 기여할 수 있는 경부 뇌척수막의 비후화는 모든 용량에서 치료한 동물에서 반전되었다(도 9). 뇌의 조직학적 평가는 hIDUA 관용 개에서 LIMP2 및 GM3 저장의 용량-의존적 감소를 나타내었다(도 6a 내지 도 6b). 가장 높은 벡터 용량으로 치료한 동물은 정상 대조군과 유사한 LIMP2 및 GM2 염색을 나타내었으며; 가장 낮은 용량에서, 일부 마커(LIMP2 및 Hex)에서 측정 가능한 개선이 있었던 반면, GM2 축적은 분명하게 감소되지 않았다. 따라서 저용량의 10^{10} 개의 GC/kg은 최소 유효 용량(MED)이 되는 것으로 나타났다.
- [0525] IT AAV9.CB7.hIDUA의 MED는 인간 단백질에 대한 혼재 면역 반응의 부재 하에서 효능을 평가하기 위해 인간 IDUA에 대해 이전에 관용된 8마리의 MPS I 개에서 확립되었다. 1개월령에 개를 IT AAV9.CB7.hIDUA로 치료하고 나서, 6개월 이후 뇌 저장 병리의 평가를 위해 안락사시킨다. MED의 확립은 LIMP2 및 GM3을 포함하는 CNS 조직에서 MPS I 질환의 잘 특성구명된 조직학적 측정을 이용하였다. 라이소좀 저장 병리의 모든 측정을 평가한 가장 높은 용량에서 정규화하였다(10^{12} 개의 GC/kg 체중). 이 코호트에서 동물은 GM3 또는 LIMP2 저장에 대해 정상 범위에 도달되지 않았지만, 10배 더 낮은 용량(10^{11} 개의 GC/kg 체중)에서 일관된 개선이 관찰되었다. 가장 낮은 용량(10^{10} 개의 GC/g 체중) 그룹에서, 라이소좀 저장의 조직학적 증거는 LIMP2 염색에 의한 보통의 개선 및 GM3 축적에서 최소의 개선을 나타내었다. 따라서 본 발명자들은 1010개의 GC/kg 체중이 IT AAV9.CB7.hIDUA에 대한 MED라는 것을 추정한다. 뇌 저장 병변의 용량-의존적 분해는 CSF IDUA 활성과 상관 관계가 있었고, CSF 스퍼민 농도와 반비례로 상관관계가 있었는데, CSF IDUA 활성 및 CSF 스퍼민은 임상 연구에서 AAV9.CB7.hIDUA 약력학의 평가를 위한 유용한 바이오마커일 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0526] 이들 데이터는 AAV9.CB7.hIDUA의 MED가 MPS I 개에서 10^{10} GC/kg이라는 것을 나타낸다.
- [0527] AAV9.CB7.hIDUA 투여는 또한 미경험 MPS I 개에서 평가하였다. MPS I 개(5)는 1개월령에 AAV9.MPSI 시험 벡터의 척추강내 주사를 받았다. 10^{11} 개의 GC/kg 체중 및 10^{12} 개의 GC/kg 체중으로 치료한 모든 동물은 경증의 자기-제한 림프구 세포증다증을 나타내었다. 이들 동물은 연구 내내 건강한 상태를 나타내었고, 주사 6개월 후 부검 시 뇌, 척수 또는 뇌척수막에서 염증의 증거는 없었다. 10^{13} 개의 GC/kg 체중의 용량으로 치료한 2마리 개는 초기에 팬츠는 상태로 나타났지만, 주사 3주 후에 요수 내 죽은 운동 뉴런을 둘러싸는 단핵구 세포에 의해, 더 중증의 세포증다증 및 형질도입 세포에 대한 T 세포 반응의 조직학적 증거와 일치되는 신경학적 징후가 발생되었다. 이들 결과는 형질도입된 척수 운동 뉴런을 표적화하는 림프구에 의해 매개된 용량-의존적 면역학적 독성과 일치된다. 인간과 개 IDUA 단백질 사이의 서열 차이를 고려하여, 인간 IDUA가 개에서 면역원성이라는 것은 놀랍지 않다.
- [0528] 비-관용 유도 MPS I 개에서, MTD는 10^{12} GC/kg이었다. MTD는 인간 단백질에 대한 개 면역 반응에 기반하기 때문에, 이는 MTD의 보존적 추정이다. 1개월령 개의 45 g 뇌 질량 규모로, 그리고 2kg의 평균 체중에 의해, 이 용량은 9×10^{10} 전체의 MED 또는 2×10^9 개의 GC/g 뇌 질량, 또는 성인 인간에서 대략 1.4×10^{13} GC 전체(1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량) GC(GC/g 뇌 질량 기준으로 대략 5x 개 MED)에 대응한다.
- [0529] 4. 신생아 MPS I 개에서 재조합 hIDUA의 주입은 척추강내 AAV9-매개 hIDUA 발현에 대한 관용을 유도하기에 충분하다
- [0530] 인간 IDUA의 간 발현이 관용 유도에 필수적인지의 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 1개월령에서 척추강내 AAV9 주사 전에 생후 7일 및 14일에 재조합 인간 IDUA(0.58mg/kg)의 주입으로 2마리의 MPS I 개(I-663 및 I-664)를 치료하였다. 인간 IDUA를 발현시키는 벡터로 신생아로서 치료된 개와 유사하게, 효소-치료 개는 지속적으로 고수준의 CSF IDUA 활성(도 2a 내지 도 2b) 및 인간 IDUA(도 2) 또는 CSF 세포증다증(도 4a 내지 도 4b 3)에 대한 최소 항체 반응을 나타내었다. 뇌 헥소사미니다제 활성은 감소되었고(도 5) 저장 병변은 동물 둘 다에서 효과적으로 없어졌다(도 6a 내지 6b).
- [0531] C. 논의
- [0532] MPS I의 치료를 위한 척추강내 AAV9 전달 효능 평가는 CSF 내로 주사를 통해 달성될 수 있었던 벡터 분포와 질환-특이적 마커에 대한 형질도입 정도의 영향 둘 다의 평가가 필요하였다. 이들 연구는 질환 병리생리학을 정확

히 반영할 수 있는 동물 모델의 사용이 필요한 반면, 또한 임상 전달 방법의 의미있는 평가 및 얻어진 벡터 분포를 허용하는 충분히 유사한 크기 및 해부학을 나타낸다. MPS I의 개 모델은 동일한 생화학적 및 조직학적 병변뿐만 아니라, 다수의 동일한 임상 징후를 나타내는 인간 표현형을 충실하게 복제한다[KP Menon, et al, Genomics, 14: 763-8 (1992); RM Shull, et al, (1984); RM Shull et al, (1994); C Ciron et al, Ann Neurol, 60: 204-213 (2006); P. Dickson et al, Ann Neurol, 60: 204-213 (2006)]. 인간에서 MPS I에 대한 표현형 유사성에 기인하여, MPS I 개는 전신 질환의 치료를 위한 효소 대체 요법의 개발에서 광범위하게 사용되었다[RM Shull et al, PNAS 91: 12937-12941 (1994); P. Dickson et al, J Clin Invest, 118: 2868-2876 (2008)]. MPS I 개는 또한 척수 압박 및 수두증이 산발적으로 발생하는 질환의 CNS 징후를 모방한다[P. Dickson, et al, Mol. Genet. Metab. 99, S15-S15 (2010); P. I. Dickson, et al, Mol. Genet. Metab. 98, 70-70 (2009); C. H. Vite, et al, Comp. Med. 63, 163-173 (2013)]. MPS I 개에 대한 인지 연구는 보고되지 않았지만, 뇌에서 조직학적 및 생화학적 징후는 잘 특성구명되었고, 중증 형태의 질환을 갖는 인간에서의 발견을 충실하게 개괄한다[RM Shull (1984); C. Ciron (2006); SU Walkley, et al, Acta Neuropathol. (Berl.) 75, 611-620 (1988)]. MPS I 개 뇌는 라이소좀 막 단백질(LIMP2) 및 강글리오사이드(GM3)의 축적, 및 라이소좀 효소, 예컨대 헥소사미니다제(Hex)의 상향조절을 입증한다. 강글리오사이드 축적은 MPS I 및 다른 라이소좀 저장 질환에서의 인지 기능과 상관관계가 있으며, 따라서 질환 중증도 및 치료 결과를 평가하는 데 중요한 마커이다[S. U. Walkley, M. T. Vanier, Secondary lipid accumulation in lysosomal disease, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1793, 726-736 (2009); G. Constantopoulos, et al, J. Neurochem. 34, 1399-1411 (1980)]. MPS I 개는 또한 환자에서 동정된 것과 유사한 신경 형태의 변화를 나타낸다[SU Walkley, (1988)]. 이들 현저한 유사성은 이를 인간에서 MPS I의 CNS 징후를 위한 신규한 요법으로서 척추강내 AAV 전달의 평가를 위한 강력한 모델로 만들었다. IT AAV9 전달뿐만 아니라 CNS에서 얻어진 벡터 분포를 위해 임상적으로 사용되는 투여 경로를 복제하는 거대 동물 모델의 능력은 이들 연구에 대한 MPS I 개의 적절성을 추가로 뒷받침하였다.

[0533]

MPS I 개는 임상 벡터의 평가를 위한 우수한 모델이 되는 것으로 나타났지만, 인간 IDUA에 대한 면역 반응은 중요한 장애물을 제공하였다. 이전의 연구로부터, MPS I 개에서 인간 IDUA에 대한 면역 반응은 환자에서 관찰된 것보다 훨씬 더 극심하다는 것은 분명하다. 개와 MPS I 환자 둘 다에서 단백질의 정맥내 전달은 종종 항체를 유발하였지만; 그러나, 개에서 이들 반응은 가장 강하였고, 지속적인 투여 시 감소될 가능성이 더 적으며, 더 흔하게는 후속적 주입에 대한 과민성 반응과 관련된다[RM Shull, et al, 1994]; E. Kakkis, et al, Proc Natl Acad Sci U A 101, 829-34 (2004)]. CNS에서 인간 IDUA에 대한 면역 반응의 차이는 훨씬 더 현저하며; 효소의 척추강내 주입으로 치료된 MPS I는 뇌수막염뿐만 아니라 CSF에서 검출 가능한 항체 반응의 증거를 나타낸다. 대조적으로, 단백질의 반복된 IT 주입으로 치료한 소아와 성인 MPS I 환자 둘 다에 대해, 유사한 유해 효과는 없었으며, IDUA 단독 하나에 대해 CSF 항체에 대해 시험한 5명의 환자는 양성이었다[C. Ciron (2006); P. Dickson, et al, (2010); P. I. Dickson, et al, Mol. Genet. Metab. 98, 70-70 (2009); P. I. Dickson, et al, Mol. Genet. Metab. 101, 115-122 (2010); P. I. Dickson, et al, Mol. Genet. Metab. 93, 247-247 (2008); E. Kakkis, et al, Mol. Genet. Metab. 83, 163-174 (2004); T. C. Lund, et al, Mol. Genet. Metab. 111, S74 (2); M. Vera, et al, Pediatr. Res. 74, 712-720 (2013)]. 흥미롭게도 MPS I 개는 또한 인간 효소보다 더 낮은 수준에도 불구하고 개 IDUA에 대한 CSF 항체가 발생하는데, 이는 이 모델이 비-종-특이적 단백질의 사용에 의해 악화된 IDUA에 대한 면역에 대해 더 큰 전반적 경향을 가진다는 것을 시사한다. MPS I 개 및 환자에서 인간 IDUA의 정맥내와 척추강내 전달 둘 다의 결과의 이들 현저한 차이는 MPS I 개에서 인간 IDUA에 대한 지속적으로 악화된 면역 반응을 나타내며, 이 반응의 방지는 인간에서 예상된 벡터 활성을 복제하는 것이 필수적이라는 것을 시사한다. 신생아 노출을 통한 단백질의 관용 유도는 악화된 면역 반응의 방해 없이 이 모델에서 인간 벡터의 효능 평가를 허용하였다. 이 제공된 중요한 정보는 가장 적절한 동물 모델에서 최소 유효 용량 - 인간에서 처음인 유전자 요법 시험의 설계에서 본질적 인자의 정확한 결정을 허용한다. 더 특별하게는, 광범위 용량-범위 연구가 MPS I 개에서 수행되었다. 면역-관용 동물에서 최소 유효 용량을 결정하였고, 본 명세서에 기재된 oqPCR 방법에 의해 결정하여 2×10^9 GC/g 뇌 질량의 용량이 되는 것으로 추정한다. 용량-범위 안전성은 면역 적격(즉, IDUA- 및 AAV-미경험) 개에서 수행하였고, 10^{12} 개의 GC/g의 용량에서 독성을 관찰하였다. 면역-매개 독성의 엄격한 개 모델에서 10^{12} 개의 GC/g에서 용량-제한 독성(DLT)의 발견에 기반하여, 레서스 마카크에서 형식적 우수 실험실 관리기준(GLP) 독성연구에서 10배 더 낮은 용량을 투여할 것이다. 형식적 GLP 비인간 영장류(NHP) 독성 연구에서 평가할 용량은 1.1×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량일 것이다. 독성과 접하지 않는다면, 임상 시작 용량은 1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량일 것이다. 이 시작 용량은 개 MPS I 모델에서의 최소 유효 용량(MED)보다 대략 5배 더 크며, 거의 MPS I 개 및 고양이 연구에서 믿을 수 있는 조직학적 반응을 입증한 용량만

큼 큰데, 이는 이 용량에서 임상 효능의 합리적인 예상을 뒷받침한다. 시작 용량은 또한 독성이 MPS I 개에서 관찰된 용량보다 대략 90배 더 낮고 비인간 영장류에서 시험한 용량보다 10배 더 낮으며, 벡터- 또는 이식유전자-관련 독성에 대해 더 큰 민감도를 나타내는 인간 대상체의 잠재력을 설명하기 위한 허용 가능한 안전성 여지를 제공한다. 이들 데이터에 기반하여, 시작 용량은 허용 가능한 유익:유해 프로파일을 나타내며, 여기서 용량은 치료적 범위에 있는 것으로 예상되지만(따라서, 임상 이점을 제공할 수 있음), 독성 벡터 용량 미만이 되는 것으로 예상된다(따라서, 합리적으로 안전하여야 함). 이하의 계산은 개에서의 용량이 인간에서의 시작 용량으로 추정하는 방법을 나타낸다: 1-개월 개 뇌 = 45 그램; 미경험 개: MED 9×10^{10} 개의 총 GC(2×10^9 개의 GC/g 뇌 질량). 성인 인간 뇌 = 1300 그램 인간: 시작 용량($5 \times$ 개 MED). 1.4×10^{13} 개의 총 GC(1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량). 이 접근 없이, 선택사항만이 중-특이적 이식유전자를 갖는 벡터로부터 효능 데이터를 추론하는데, 이는 효능의 중요한 차이를 가질 수 있거나, 또는 인간 단백질에 대해 더 면역관용이니 덜 대표적인 동물 모델에 대한 연구를 움직이게 한다. 신생아 관용-유도 프로토콜은 면역-억제 약물의 2차 결과를 피하는 분명한 이점을 갖지만, 이 상황에서 약학적 면역 억제를 또한 사용할 수 있다.

[0534] 효능 평가는 인간 벡터로 치료한 비관용 유도 개에서 순환 IDUA의 면역 반응 및 상실에 의해 수행하지만, 이들 동물로부터 일부 유용한 데이터가 유도될 수 있다. 강한 면역 반응은 인간에서 면역 반응을 나타낼 가능성이 없지만, 면역-매개 독성의 중요한 특징을 입증함으로써 처음의 인간 연구에 대한 모니터링 계획을 알릴 수 있었다. 이 경우에, 본 발명자들은 면역-매개 독성이 용량 의존적이고, 면역 반응의 피크가 벡터 투여 3주 후에 일어나며, 척수 운동 뉴런의 높은 형질도입에 기인할 가능성이 있는 초점성 운동 증상이 존재하고, CSF 세포증다증을 수반한다는 것을 관찰하였다. 이들 발견은 벡터 투여 후 몇 주 동안 연장되는 면역-매개 독성 및 신경학적 증상에 대한 강력한 모니터링, 및 주사 2 내지 4주 후에 생기는 세포증다증에 대한 CSF 분석과 함께 1상 시험 프로토콜에 직접 통합될 수 있다. 세포증다증을 수반하는 신경학적 증상이 인간 연구 대상체에서의 유사한 역학과 함께 나타났다면, 미경험 개에서의 발견은 독성이 면역 반응(예를 들어, 과발현 독성과 대조적)에 기인하며 치료적 결정을 가이드할 수 있다는 것을 시사한다.

[0535] 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 MPS I 개에서 벡터 용량, CSF 효소 수준과 뇌 저장 병변의 교정 사이에 강한 상관관계가 있었다. CSF에서의 IDUA 활성화와 뇌 병리의 교정 사이의 상관관계는 이 접근이 인간 시험으로 진행됨에 따라 가치 있는 관찰일 수 있으며, 여기서 CSF에서 검출된 IDUA 활성화는 임상 반응의 유용한 예측자일 수 있다. CNS 저장 병리의 중증도를 직접적으로 반영하는 CSF 마커의 동정은 훨씬 더 유용할 것이다. CSF 바이오마커는 MPS I 환자에서 근본적인 CNS 병리의 교정을 평가하기 위한 가치있는 도구일 것이며, 개 모델은 이러한 마커의 동정을 위한 이상적인 시스템일 수 있었다. 본 연구에서, 본 발명자들은 하나의 잠재적인 CSF 바이오마커, 즉, 효소 헥소사미니다제를 평가하였다. MPS I 개의 뇌 조직에서 실질적으로 상승되었지만, Hex 활성화는 CSF에서 단지 보통으로 상승되었다. 조직 반응 정도와 상관없이 CSF Hex는 모든 치료 동물에서 정상화되었다. 따라서, CSF Hex는 임상 연구에서 벡터 활성을 확인하는 데 유용할 수 있지만, 치료 반응을 예측할 가능성은 없다. MPS I 개 모델을 이용하는 추가 연구는 추가적인 CSF 마커의 평가 및 뇌 저장 병변과 그들의 상관관계를 허용할 수 있는데, 이는 MPS I에서 CNS 연루의 중증도 및 신규한 치료제의 영향을 비-침습적으로 평가하기 위한 강력한 새로운 도구를 궁극적으로 수득할 수 있었다.

[0536] 본 발견은 인간 IDUA에 대한 신생아 노출이 2종의 상이한 효소 공급원을 이용하여 관용을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 실시예 3은 AAV-매개 발현이 신생아에서 이식유전자-특이적 관용을 유도할 수 있다는 것을 나타내지만, 본 실시예는 제조합 효소의 주입이 관용을 유도할 수 있었다는 것을 나타낸다. 이 접근이 다른 단백질에 대해 일반화될 수 있다면, 동물 모델에서 다수의 인간 치료제의 더 정확한 전임상 평가에 유용할 수 있었다. 추가로, 유사한 접근이 인간 신생아에서 외래 단백질에 대한 관용을 유도할 수 있었다면, 정상 단백질에 대한 항체 반응이 효능을 제한하는 질환에 대한 단백질 대체 요법의 효능을 개선시킬 엄청난 가능성을 가질 수 있었다. 대부분의 MPS I 환자는 척추강내 IDUA 주입을 용인하는 것으로 나타나지만, 대다수는 정맥내 효소 대체에 대한 혈청 항체가 발생되며, 이들 항체는 요법에 대한 반응이 감소될 수 있다. 신생아 관용 유도를 유전자 또는 단백질 대체 요법과 조합하는 것은 환자 결과를 실질적으로 개선시킬 수 있다. 승인된 제조합 효소의 이용 가능성은 MPS I를 이 접근의 초기 인간 시험에 대한 우수한 후보로 만들 것이다. 인간 신생아가 관용 유도 동안 1 내지 2주의 동일한 창을 나타낸다면, 신생아 선별은 성공적인 개입을 위해 충분히 초기에 환자를 동정하는 데 필수적일 것이다. 따라서 MPS I 및 다른 라이소좀 저장 질환에 대한 신생아 선별의 진행중인 실행은 신생아 관용-유도 프로토콜의 임상 평가에 굉장히 중요할 것이다.

[0537] 실시예 4 - 청소년 래서스 마카크에서 척추강내 AAV-매개 인간 IDUA 유전자 전달

- [0538] A. 척추강내 전달
- [0539] 본 연구의 목적은 6 내지 9개월령의 인간과 발달적으로 유사한 모델인 1개월령 레서스 마카크에서 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터인 AAV2/9.CB7.CI.hIDUAco.RBG의 척추강내(IT) 투여의 안전성을 평가하는 것이다. 추가로, 본 연구는 혈청 또는 뇌척수액(CSF) 중의 이식유전자 산물에 대한 항체가 벡터 투여의 안전성 및 인간 IDUA의 활성화에 영향을 미치는지의 여부를 평가하였다.
- [0540] 본 연구는 4마리의 레서스 마카크를 포함하였다. 파일럿 연구는 마카크가 인간 α -L-이두로니다제(IDUA)에 대한 항체가 발생할 수 있다는 것을 나타내었다. 인간 IDUA 이식유전자 산물에 대한 항체 반응은 마카크에서 예측되었기 때문에, 동물 중 2마리는 간-특이적 프로모터로부터의 인간 IDUA를 발현시키는 AAV8 벡터(AAV2/8.TBG.PI.CO.hIDUA.nRBG)의 정맥내(IV) 투여에 의해 출생 시에 관용 유도되었다. AAV8 벡터에 대한 절차적 효과 및 노출을 제어하기 위해, 다른 2마리의 마카크는 출생 시 부적절한 이식유전자(인간 응고인자 IX(AAV2/8.LSP.IVS2.hFIXco.WPRE.BGH) IV를 발현시키는 AAV8 벡터를 투여하였다. 생후 1개월에, 모두 4마리의 동물에 IT 주사에 의해 3×10^{12} GC/kg의 용량으로 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터인 AAV2/9.CB7.CI.hIDUAco.RBG를 투여하였다. 보고서 발행 시 투여 후 16개월 동안 동물을 관찰하였고, 적어도 1년 초과 동안 연구 중에 남겨 둘 것이다. 연구 전체적으로 평가된 종말점은 일반적 관찰, 체중 및 포괄적인 임상 병리(차별적 및 혈청 화학에 의한 혈액 세포 계수). 추가로, 이식유전자에 대한 IDUA 효소 활성화 및 항체 반응을 CSF에서 측정하였다.
- [0541] 본 연구는 벡터 관련 병변이 없다는 것과 임상 후유증이 없다는 것(0)을 나타내었다. 모든 동물은 정상 성장 궤도를 나타내었다. 혈청 화학 및 혈액 세포 계수는 비슷한 연령 및 수용 조건의 이력 대조군 레서스 마카크의 정상 범위 내에 있었다. 이식유전자에 대한 항체는 2마리의 비-관용 유도 동물의 CSF에서 검출되었지만, 신생아로서 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 2마리 동물에서는 검출되지 않았다. IDUA-관용 유도 동물 둘 다에서, 기준 수준보다 적어도 15% 초과 IDUA 활성화는 연구 내내 CSF에서 검출 가능하였다. 비-관용 유도 동물에서, CSF IDUA 활성화는 AAV9.MSPI 시험 벡터 투여 후에 빠르게 증가되었지만, 항체 유도 후 기준으로 떨어졌다. CSF에서 이식유전자-특이적 항체의 IT AAV9.CB7.hIDUA 투여의 안전성에 대해 영향이 없었지만 CSF에서 인간 IDUA 수준을 검출하는 능력에 영향을 미치지 않았다.
- [0542] 결론적으로, AAV9.CB7.hIDUA의 단일 용량의 척추강내 투여는 3×10^{12} GC/kg의 용량에서 1개월령 레서스 마카크에서 잘 용인되었다. 이 용량에서, 기준의 적어도 15% 초과 IDUA 수준은 출생 시 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 동물의 CSF에서 검출 가능하였고; 관용 유도되지 않은 동물은 CSF에서 검출 가능한 hIDUA에 대해 항체 반응이 발생하였으며 hIDUA 발현과 음으로 상관관계가 있었다. 항-IDUA 항체에 대해 양성인 동물 또는 항체-양성이 아닌 동물에서 치료에 기인하는 성장, 거동 또는 임상 화학 또는 혈액학 매개변수에 대한 효과는 관찰되지 않았다.
- [0543] A. 물질 및 방법
- [0544] 본 연구에서 사용한 벡터는 rAAV9.hIDUA, rAAV8.hIDUA, 및 부적절한 이식유전자(hFIX)를 갖는 AAV8 벡터를 포함한다.
- [0545] 후두골 천자를 통한 척추강내(IT) 투여는 그것이 임상 용도를 위한 제안된 경로이기 때문에 선택하였다. 본 연구는 동물의 체질량에 대해 등급화한 단일 벡터 용량을 평가하였다. 2마리 동물에 인간 IDUA에 대한 면역 관용을 유도하기 위해 생후 1일(연구 제0일)에 rAAV8.hIDUA(10^{12} 개의 GC/kg)의 IV 주사를 투여하였다. 대조군 동물에 생후 1일에 간 특이적 프로모터(rAAV8.hFIX)로부터의 부적절한 이식유전자(인간 인자 IX)를 발현시키는 대조군 벡터를 투여하였다. 이어서, 모든 동물에 1개월령(연구 제30일)에 후두골 천자에 의해 IT AAV9.MPSI 시험 벡터를 투여하였다.
- [0546] B. 결과 및 결론
- [0547] 4마리의 1개월령 레서스 마카크(마카크 플라타(*M. mulatta*))에 IT 3×10^{12} GC/kg rAAV9.hIDUA를 투여하고 나서, 벡터 투여 후 1년 초과 동안 모니터링하였다. 이들 동물 중 2마리는 출생 시 인간 IDUA 단백질에 대해 관용 유도하였다.
- [0548] 체중 또는 체중증가에 대한 치료 관련 효과 및 치료-관련 임상 징후는 없었다. 임상 화학 또는 혈액학 매개변수에 대한 치료-관련 효과는 없다. 이식유전자 산물에 대한 항체는 인간 단백질에 대해 관용을 유도하도록 전처리

되지 않는 2마리 동물의 CSF에서 검출 가능하였다. 관용 유도된 동물과 관용 유도되지 않은 동물 사이에 평가한 종말점(임상 징후, 체중, 혈액 및 임상 화학)의 차이는 없었는데, 이는 단백질에 대한 CSF 항체가 명확한 독성과 관련되지 않았다는 것을 나타낸다. IDUA 관용 유도 동물에서, 한 마리 동물에서 기준 수준의 2배 초과로 그리고 다른 동물에서 기준의 대략 15% 이상으로 CSF에서의 지속적인 IDUA 발현이 있었다.

[0549] 결론적으로, rAAV9.CB7.hIDUA의 단일 용량의 척추강내 투여는 3×10^{12} 개의 GC/kg의 용량에서 1개월령 레서스 마카크에서 잘 용인되었다. 이 용량에서, 기준의 115 내지 200%의 hIDUA 수준은 출생 시 인간 IDUA에 대해 관용 유도된 동물의 CSF에서 검출 가능하였고; 관용 유도되지 않은 동물은 CSF에서 검출 가능한 hIDUA에 대해 항체 반응이 발생하였으며 hIDUA 발현과 음으로 상관관계가 있었다. 항-IDUA 항체에 대해 양성인 동물 또는 항체-양성이 아닌 동물에서 치료에 기인하는 성장, 거동 또는 임상 화학 또는 혈액학 매개변수에 대한 효과는 관찰되지 않았다.

[0550] 실시예 5 - 사이노물거스 마카크에서 척추강내 AAV-매개 인간 IDUA 유전자 전달

[0551] 벡터는 거대세포바이러스 프로모터(CMV), 키메라 인트론(PI), 코돈-최적화된 인간 IDUA 이식유전자(hIDUA) 및 폴리아데닐화 신호(SV40)로 이루어진 발현 작제물을 패키징하는 AAV9 캡시드로 이루어졌다. 발현 작제물은 AAV 혈청형 2 반전 말단 반복부에 축적된다. 본 연구에서 사용하는 하나의 벡터가 있지만, 이 벡터는 AAV2/9.CMV.PI.hIDUA.SV40, AAV2/9.CMV.PI.hIDUAco.SV40, AAV2/9.CMV.PI.hIDUAco.SV40PA 또는 AAV9.CMV.PI.hIDUA.SV40로서 표기한다.

[0552] A. 물질 및 방법

[0553] 본 연구는 2마리의 암컷 사이노물거스 마카크(ID 06-09 및 07-19)를 포함하였다. 마카크는 둘 다 AAV2/9.CMV.PI.hIDUAco.SV40PA의 10^{12} 개의 게놈 복제물/체중의 킬로그램(GC/kg)을 받았다. 후두골 천자를 통한 척추강내(IT) 경로는 그것이 임상 용도를 위한 제안된 경로이기 때문에 선택하였다.

벡터	주사 시 체중 (kg)	용량/kg 중량	총 용량
AAV2/9.CMV.PI.hIDUAco.SV40PA	3.90	1.00E+12	3.90E+12
AAV2/9.CMV.PI.hIDUAco.SV40PA	4.60	1.00E+12	4.60E+12

I. 뇌 질량 (g) 당 용량은 90g 뇌를 기준으로 한다.

[0554]

[0555] B. 결과 및 결론

[0556] 2마리의 성체 암컷 사이노물거스 마카크를 CMV 프로모터로부터 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터의 척추강내 주사로 치료하였다. 체중, 신체검사 및 혈구 계수 및 혈청 화학을 벡터 투여 후 연구 1, 7, 14, 28, 91, 118, 147, 182, 208, 239, 261, 294, 322, 350, 378, 413, 434, 462, 490, 518, 561, 589, 624 및 636일에 평가하였고, 이후에 조직병리학 및 벡터 생체내 분포의 분석을 위해 동물을 부검하였다. 벡터-관련 임상 부작용은 없었다. 한 마리의 동물은 벡터 투여 후 600일에 대퇴부 동맥류가 발생되었다. 이는 반복된 혈액 수집에 대해 2차적인 것으로 여겨지며, 치료와 관련될 가능성은 없다. 최종 CSF 매개변수를 포함하는 임상 병리 매개변수에 대한 치료-관련 효과는 없었다. 조직병리학은 CNS 병리에 대한 증거를 나타내지 않았고, 말초 기관에서 분명한 벡터-관련 이상은 없었다. 생체내 분포 분석은 한 가지를 제외하고 말초 기관에서 10배 내지 10^2 배 더 높은 NHPS 둘 다의 뇌 및 척수 전체적으로 벡터 침착을 나타내었다. AAV9 캡시드에 대해 이미 존재하는 중화 항체 없이 한 마리 동물에서 상당한 간 분포가 생겼지만, 벡터에 대한 이미 존재하는 혈청 항체를 갖는 동물은 최소 간 형질 도입을 나타내었다. 동물 둘 다로부터의 뇌 절편의 면역염색은 인간 IDUA의 발현을 입증하였다.

[0557] 본 연구는 IT AAV9-매개 유전자 전달이 뇌에서 IDUA의 장기간 발현을 허용할 수 있는 증거를 제공하였다. 본 연구는 또한 이 접근의 안전성의 예비 증거를 제공하였다.

[0558] 실시예 6 - hIDUA에 대해 이미 존재하는 면역 상황에서 마우스에서의 뇌실내(ICV) AAV9.hIDUA 전달

[0559] 치료 미경험 마우스뿐만 아니라 이식유전자 산물인 인간 이두로니다제(IDUA)에 대해 이미 존재하는 항체를 갖는 마우스에서 AAV9.hIDUA 벡터의 뇌실내(ICV) 투여 후 독성의 조직학적 증거를 평가하기 위한 이런 파일럿 연구를

설계하였다.

- [0560] 시험 항목은 닭 베타 액틴 프로모터(CB7), 키메라 인트론(CI), 코돈-최적화된 인간 IDUA 이식유전자(hIDUAco) 및 폴리아데닐화 신호(RBG)로 이루어진 발현 작제물을 패키징하는 AAV9 캡시드로 이루어졌다. 발현 작제물은 AAV 혈청형 2 반전 말단 반복부에 축적된다. 이 벡터는 AAV9.CB7.CI.hIDUA.RBG 중 하나로서 표기한다. 최종 산물을 엘리엇 제형 완충제(EPB) 중에 희석시켰다.
- [0561] 이런 비-GLP 연구는 본래 사전 면역화된 마우스에서 GLP 독성 연구를 설계하는 것을 돕도록 계획하였지만, 정상 마우스에서 비-종 특이적 단백질에 대한 면역화에 기반한 실험 설계가 효소 대체 요법(ERT)로 치료한 환자를 나타낼 가능성이 없다는 FDA 피드백에 기반하여 GLP 연구를 수행하지 않았다. 사전 면역화된 마우스에서 GLP 독성 연구를 수행하는 것에 대한 결정을 할 때, 초기 파일럿 연구는 이미 진행중이었다. 파일럿 연구 결과는 이 보고를 포함한다.
- [0562] 본 연구는 100명의 성인 C57BL/6 마우스(50마리/성별)를 포함하였다. 동물의 절반을 보조제(타이터맥스(TiterMax)) 중의 제조합 인간 IDUA(알두라자임(등록상표))의 단일 근육내(IM) 주사를 이용하여 인간 IDUA에 대해 면역화시켰다. 면역화한 동물과 미경험 동물 둘 다의 면역화의 6개월 후에 동물을 2회 용량 중 1회(5×10^{10} 개의 GC 또는 2.5×10^{11} 개의 GC)에서 AAV9.hIDUA의 ICV 주사로 치료하였다. 각각의 치료 그룹으로부터의 동물을 벡터 투여 후 5회 시점(제7일, 제14일, 제30일, 제60일 또는 제90일) 중 1회에 희생시켰다. 조직병리학을 위해 뇌, 척수, 심장, 폐, 간, 비장, 신장 및 성샘을 채취하였다.
- [0563] 미경험(비면역화) 코호트(n = 50, 25마리/성별)에서, 계획된 부검 전에 죽거나 또는 임상 이상을 보인 동물은 없었다. 뇌 조직병리학은 측면 뇌질의 팽창을 나타내었고, 일부 동물에서 눈에 보이는 바늘 자국은 ICV 투여 경로와 일치되었다. 뇌척수막 및/또는 뇌 실질의 최소 내지 경증의 림프구 침윤이 50마리 마우스 중 12마리에서 일어났으며, 벡터 용량 또는 주사 후 시간과 분명한 상관관계를 나타내지 않았다. 용량 의존적이고 벡터 투여 후 시간과 상관관계가 있는 방식으로 간염이 일어났다. 벡터 투여 후 14일에 희생시킨 고용량 코호트 내 모두 5마리 동물에서 최소 내지 중등증의 간염이 일어났다. 제7일, 제30일, 제60일 또는 제90일에 희생시킨 고용량 동물에서 단지 최소의 간염이 관찰되었다. 저용량 코호트에서 최소의 간염만이 관찰되었고; 이는 벡터 투여 후의 시간과 분명한 상관관계가 없는 8마리 동물에서 생겼다. 벡터 투여 60일 후에 고용량 코호트 내 한 마리 동물에서 중등증의 심근염이 생겼고; 고용량 코호트 내 3마리의 추가 동물은 벡터 투여 후 30 또는 90일에 최소 심근염을 나타내었다. 저용량 코호트 내 2마리 동물은 최소 심근염을 나타내었고, 한 마리는 경증의 심근염을 나타내었으며; 모두 벡터 투여 후 60일에 생겼다. 미경험(비-면역화된) 코호트에서 관찰되는 다른 잠재적인 벡터-관련 이상은 없었다.
- [0564] 벡터 투여 전 인간 IDUA에 대해 면역화된 코호트(n = 50, 25마리/성별)에서, 3마리 동물은 죽었다(수컷 2마리, 암컷 한 마리); 고용량(2.5×10^{11} 개의 GC)의 AAV9.CB7.hIDUA를 받은 2마리, 및 저용량(5×10^{10} 개의 GC)을 받은 한 마리. 3마리 모두 연구 제18일 또는 제19일에 죽었다. 면역화된 그룹 내 조직병리학은 말초 기관 내 형질도입 세포에 대한 중증의 세포-매개 면역 반응과 일치되며, 중등증 내지 중증의 심근염이 50마리 동물 중 8마리에서 일어났고, 중등증 내지 중증의 간염이 50마리 동물 중 8마리에서 일어났다. 발견은 둘 다 벡터 용량 및 벡터 투여 시간과 상관관계가 있었으며, 대부분의 중증의 소견은 벡터 투여의 14일 후에 일어났다. 뇌에서의 소견은 덜 중증이며; 중등증의 뇌수막염 또는 뇌염이 높은 벡터 용량으로 치료한 3마리 동물에서 그리고 낮은 벡터 용량으로 치료한 한 마리 동물에서 생겼다. 이들 소견은 벡터 투여 시간과 상관관계가 없었다. 뇌에서의 다른 소견은 최소 또는 경증이었다.
- [0565] 전반적으로 미경험(비면역화) 코호트에서의 결과는 간의 림프구 침윤에 의해 그리고 더 적은 정도로 심장에 대해(둘 다 IT 주사 후 말초 순환으로 탈출하는 AAV9에 의해 형질도입된 기관임) 증명되는 바와 같이 인간 이식유전자에 대한 면역 반응 유도과 일치된다^{1,2}. 이 상황에서, 독성은 평가한 가장 높은 용량(2.5×10^{11} 개의 GC)에서 분명하였다.
- [0566] 사전 면역화된 코호트에서, 면역화 전략은 이식유전자에 대한 강한 세포-매개 면역을 유도하여, 일부 벡터 처리 동물에서 중등증 내지 중증의 심근염 및 간염을 초래하는 것으로 나타났다. 독성은 벡터 용량과 상관관계가 있었다. 실험 설계는 정상 마우스에서 비-종 특이적 단백질에 대한 면역화를 기준으로 하기 때문에, ERT로 이전에 치료한 환자에 대한 적용 가능성은 불분명하다.
- [0567] 실시예 7 - 비-인간 영장류에서 척추강내로(IT) 주사한 AAV9.CB7.hIDUA 벡터

- [0568] 다음 비-인간 영장류(NHP) 안전성 연구는 두 가지 용량을 이용한 형광 투시 유도 후두하 주사(대조)를 수반하였다. 낮은 용량(LD)은 1.1×10^{10} 개의 GC/g이고 높은 용량(HD)은 1.1×10^{11} 개의 GC/g였다(개 최대 관용 유도된 용량(MTD)과 동등함). 면역 억제(IS)와 함께 HD를 수반하는 아암에 대해, 프로토콜은 다음과 같이 MMF 및 시롤리무스의 공동 투여를 수반하였다: -제21 일 내지 제60 일에 MMF 그리고 -제21 일부터 제90 일까지 시롤리무스. 검사된 NHP에서 임상적인 발견 및 플라즈마 화학 또는 혈액학적 매개변수의 임상적으로 유의한 이상은 없었다. 항-AAV 및 항-hIDUA 면역 반응 그리고 면역-매개 축삭병의 증거가 존재하였다. 이들 데이터는 표 22 - 23 및 아래 표에서 제공된다.
- [0569] 조직학적 결과는 도시되지 않는다. 고용량에서 배주(상행 감각 구역)에서 축삭병은 축삭병 점수 2(0 내지 4 척도)를 갖는다는 것이 발견되었다(비히클 대조군, 정상). 고용량에서 배근 신경절 신경염은 뉴런 주변 염증 세포, 신경원 변성, 위성 세포 활성화 및 증식을 갖는 것이 관찰되었다(비히클 대조군, 정상).
- [0570] AAV9.hIDUA에 대해, 신경원 변성은 DRG에 제한된다(데이터 미도시). 면역 억제 없이 고용량에서 경부 척수(복측 각)에 대해, 운동 뉴런 발현 hIDUA 주위에서 염증의 징후가 관찰되지 않는다. 면역 억제 없이 고용량에서 경부에 대해, hIDUA를 발현하는 DRG 뉴런 주위에서 염증이 관찰된다. 100개 당 약 1-2개의 뉴런의 유병률이 관찰된다. 염증 침윤은 소수의 CD68 양성 대식 세포와 함께 CD 20 양성 B 림프구 및 CD3 양성 T 림프구인 것으로 나타난다. 림프구는 hIDUA 양성 형질도입 뉴런 주위에서 클러스터링되었다. 작은 염증성 결절이 없어진 뉴런을 대체한다.
- [0571] 면역 억제는 개선되었지만 면역-매개된 DRG 신경절 신경돌기를 균일하게 방지하지 않는다(데이터 미도시). 예시된 결과는 모두 동일한 벡터를 받았지만, 면역 반응에서 차이가 있는 3마리의 상이한 동물로부터의 4개의 영상이다. 면역 억제와 함께 고용량에서 RA1404 경부(DRG)에 대해, MMR은 제36 일에 중단되고, 축삭병 점수는 0이고 누적은 0이다. hIDUA를 발현하는 DRG 뉴런 주위에 염증이 관찰되지 않는다. 면역 억제와 함께 고용량에서 RA0747 경부에 대해, 축삭병 점수(경부 1, 누적 4)에서, 염증은 hIDUA를 발현하는 DRG 뉴런 주위에서 관찰된다. CD3+ T 림프구는 유기체화되지 않거나 클러스터링되지 않는다. 침윤물에서 CD20+ 양성 B 림프구는 관찰되지 않는다. 면역 억제와 함께 고용량에서 제3 동물(RA1528) 경부(DRG)에 대해, 축삭병 점수는 경부 1, 누적 4였다. 염증은 hIDUA를 발현하는 DRG 뉴런 주위에서 관찰된다. CD3+ T 림프구 및 CD20+ 양성 B 림프구는 클러스터에서 관찰된다.
- [0572] 면역 억제는 개선되었지만 면역-매개된 DRG 신경절 신경돌기를 균일하게 방지하지 않는다. 데이터는 표 형태로 제공되고 대조군, 저용량, 고용량, 및 면역 억제와 함께 고용량을 포함한다.

그룹	(1) 비히클 그룹	(2) AAV9.hIDUA 저용량*	(3) AAV9.hIDUA 고용량*	(4) AAV9.hIDUA 고용량 + 면역억제
척수 - 축삭병				
경부	0 / 1	3 / 3 (1,2,1)	2 / 3 (0,2,2)	1 / 3 (0, 0, 1)
흉부	0 / 1	3 / 3 (1, 1, 1)	3 / 3 (1,2,1)	2 / 3 (0, 0,1)
요추	0 / 1	3 / 3 (2,2,1)	3 / 3 (1,2,1)	2 / 3 (0,0,2)
배근 신경절 신경돌기				
경부	0 / 0	1 / 2	2 / 3	2 / 3
흉부	0 / 1	2 / 3	3 / 3	2 / 3
요추	0 / 1	3 / 3	3 / 3	1 / 3

[0573]

[0574] A. 안전성 및 생체내 분포

- [0575] 본 연구는 레서스 마카크에서의 영상-가이드 후두골 천자에 의한 투여 후 180일까지 동안 AAV9.CB7.hIDUA의 안전성 및 생체내 분포를 평가하였다. 성인 레서스 마카크(n = 9, 암컷 6마리, 수컷 3마리, 그룹 1A, B 및 C)에 영상 가이드된 후두골 천자에 의해 대략 1.1×10^{11} 개의 GC/g용량의 뇌 질량에 대응하는 10^{13} 개의 GC AAV9.CB7.hIDUA의 단일 용량을 투여하였다. 추가 3마리 동물(암컷 2마리, 수컷 한 마리, 그룹 2A 및 B)에 영상 가이드 후두골 천자에 의해 단일 용량의 비히클(엘리엇 B(등록상표) +0.001% 플루로닉(등록상표) F68)을 투여하였다. 동물을 안락사시키고 나서, 시험 항목 또는 대조군 항목 투여 후에 제14일(그룹 1A 및 2A), 제90일(그룹

1B 및 2B) 또는 제180일(그룹 1C)에 부검하였다. 매일의 관찰에 의해, 그리고 연구 0, 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60 및 90일에 신체 검사, CBC 및 혈청 화학 패널, 응고 패널 및 CSF 세포계수, 단백질 및 글루코스 농도의 분석에 의해 독성을 평가하였다. 피사 시, 거대 병변에 대해 조직을 평가하고 나서, 병리학자에 의해 현미경으로 검사하였다. 백터 캡시드 및 이식유전자 산물에 대한 T 세포 반응을 ELISPOT에 의해 평가하였고, 이식유전자 산물에 대한 항체 반응을 ELISA에 의해 혈청 및 CSF에서 측정하였다. qPCR에 의해 백터 생체내 분포를 평가하였다.

[0576] 투여 절차와 관련된 부작용(AE)은 없었다. 평가한 제1 시점, 즉, 연구 제14일로부터, 모든 치료 동물(104개의 GC/ μ g DNA 주위의 수준)의 뇌 및 척수 전체적으로 AAV 백터 게놈을 검출할 수 있고, 이는 제90일 및 제180일에 안락사시키고 부검한 동물의 뇌 및 척수에서 동일한 수준으로 지속되었다. 또한 말초 기관, 특히 간 및 비장(105 내지 106개의 GC/ μ g DNA), 망상내피 조직(림프절 및 골수 103 내지 104개의 GC/ μ g DNA) 및 심장(103 내지 104개의 GC/ μ g DNA)에 대한 상당한 백터 분포가 있었다. 이들 데이터는 백터가 말초로 퍼지고, 척추강내 백터 전달 후에 간 형질도입이 가능하다는 것을 시사한다.

[0577] 인간 IDUA 단백질에 대해 면역 반응(체액성과 T-세포 매개 둘 다)이 유발되었다. 이 반응은 일시적 CSF 단핵 세포증다증과 상관관계가 있고, 척수 배측 백질 축삭병의 조직학적 소견(제90일 및 제180일에 척수 전체적으로 관찰됨)과 상관관계가 있는 것으로 여겨졌다. 이 소견은 척수의 후삭 이외의 조직에 대한 임상적 이상 또는 손상의 조직학적 증거와 관련되지 않았다. 이 소견에 기반하여, 관찰 가능한 유해 효과 수준 없음(NOEL)은 레서스 마카크에서 단일 용량의 10^{13} 개의 GC(대략 1.1×10^{11} 개의 GC/g 뇌 질량)의 검사로 나타낼 수 없었다.

[0578] 1. 물질 및 방법

[0579] AAV9.hIDUA 시험 백터를 평가하였다(엘리엇 B(등록상표) + 0.001% 플루로닉(등록상표) F68에서). 본 연구는 12 마리의 레서스 마카크를 포함하였다. 동물을 무작위로 5개 그룹에 배정하였다. 연구 그룹 1A, 1B 및 1C는 시험 백터로 처리한 수컷 한 마리 및 암컷 2마리의 마카크로 이루어지며, 연구일 14 ± 2 ; 90 ± 2 ; 또는 180 ± 2 에 각각 부검하였다. 그룹 2A 및 2B의 동물을 비히클(엘리엇 제형 완충제)로 처리하고 나서, 안락사시키고 나서, 14 ± 2 또는 90 ± 2 일에 각각 부검하였다.

[0580] 영상 가이드된 후두골 천자를 통한 IT 경로는 그것이 임상 용도를 위한 제안된 경로이기 때문에 선택하였다. 10^{13} GC의 용량을 선택하였는데, 이 용량은 MPS I 개에서 최대로 용인되는 용량과 유사하고(뇌 질량 그래프 기준 당 용량에 대해), 인간 연구에서 처음인 제안된 시작 용량보다 10배 더 크기 때문이다.

[0581] 제0일에, 동물을 마취시키고 나서, CSF 수집 및 대조 내로 투약을 위해 머리를 앞쪽으로 구부린 측압와위로 X-선 테이블 상에 위치시킨다. 주사 부위는 멸균 준비하였다. 멸균 기법을 이용하여, CSF의 유동이 관찰될 때까지, 21 내지 27 게이지, 1 내지 1.5 인치 퀴нке(Quincke) 스파이날 니들(백톤 딕킨슨(Becton Dickinson))을 후두골 공간 내로 전진시켰다. 기준 분석을 위해 1.0mL까지의 CSF를 수집하였다. 형광 투시경(OEC9800 C-아암(Arm), GE)을 이용하여 척수조영술을 통해 바늘의 정확한 위치를 확인하였다. CSF 수집 후에, 이오핵술(상표명: 움니파크 180mg/mL, 제너럴 일렉트릭 헬스케어(General Electric Healthcare)) 조영제 및 시험 또는 대조군 항목의 투약을 용이하게 하게 위해 스파이날 니들에 루어 접근 연장 카테터를 연결하였다. 1mL까지의 이오핵술을 카테터 및 스파이날 니들을 통해 투여하였다. 대조 내 조영제의 관찰에 의해 바늘의 정확한 위치를 확인한 후에, 시험 항목 또는 비히클을 수용하는 주사기(용적 1.4mL, 1mL + 주사기 및 링커 무용 공간의 용적과 동등)를 가요성 링커에 연결하고 나서, 20 내지 60초에 걸쳐 서서히 주사하였다. 바늘을 제거하고 나서, 천자 부위에 직접적인 압력을 적용하였다.

[0582] 2. 결과

[0583] 백터 투여 절차와 관련된 부작용은 없었다. 모든 AAV9.hIDUA 시험 백터의 뇌 및 척수 전체적으로 AAV 백터 게놈을 검출하였고 - 모든 시점 및 수준에서 치료 동물은 이들 조직에서 시간에 따라 비슷하였다. 또한 말초 기관, 특히 간에 대해 상당한 백터 분포가 있으며, 말초 조직에서 백터 게놈 수준은 또한 시간에 따라 비슷하였다. 비히클 대조군에서도 제14일에 안락사시킨 시험 백터 동물에서도 임상적, 중대한 또는 조직학적 소견이 없었다. 5/6 AAV9.hIDUA - 치료 동물에서 경증의, 일시적 CSF 단핵 세포증다증이 관찰되었고 투약 후 대략 30일에 최대가 되었다.

[0584] 제21일에 6/6 AAV9.hIDUA 시험 백터 - 치료 동물에서 hIDUA(이식유전자 산물)에 대한 혈청 및 CSF 항체를 검출하였고, 제90일에 시험 백터 처리한 동물의 4/6에서 그리고 제180일에 시험한 동물의 1/3에서 hIDUA 펩타이드에 대한 말초 T 세포가 관찰되었다. 미시적으로, 6/6 AAV9.hIDUA 시험 백터 - 치료 동물에서, 배근 신경절의 감각

뉴런 내의 세포 신체 손상을 시사하는 척수의 배측 감각 백질관에서 최소 내지 중등증의 축삭병이 있었다(조직학적 평가에 대해 이용 가능하지 않은 DRG). 위를 향한 배측 감각관에서 축삭병의 해부학적 위치는 배근 신경절로부터의 감각 뉴런의 특이적 관여를 시사한다. 해당 뉴런이 보통 척추강내 AAV 투여 및 CSF 세포증다증의(제21일로부터) CSF 항체의 시간 과정(제30일에 최대), 및 제90일에 대다수의 동물에서 이식유전자 특이적 T-세포 반응의 존재 후에 심하게 형질도입되었다는 사실은 hIDUA에 대한 세포 매개 세포독성 면역 반응이 배근 신경절에서 발생하였다는 것을 시사한다.

[0585] B. NHP 독성

[0586] 본 탐구 GLP 연구의 목적은 2가지 용량 수준, 1×10^{12} 개의 총 GC(1.1×10^{10} 개의 GC/g 뇌 질량) 및 1×10^{13} 개의 총 GC(1.1×10^{11} 개의 GC/g의 뇌 질량)로 IC 투여된 AAV9.hIDUA 검사 벡터의 안전성을 평가하고 고용량으로 IC 투여된 R AAV9.hIDUA 검사 벡터의 안전성에 대한 면역 억제 용법의 효과를 평가하는 것이었다. 면역 억제 요법은 AAV9.hIDUA 검사 벡터 투약 전 적어도 2주에 시작하여 매일 제공되고 시클리무스에 대해 10 내지 15 $\mu\text{g/L}$ 및 마이코페놀레이트 산(MMF)의 활성 대사물질)에 대해 2 내지 3.5 $\mu\text{g/mL}$ 에 가능한 가깝게 혈장 트로프 수준을 유지하는 용량으로 제60 일(MMF) 및 제90 일(시클리무스)을 통해 지속되는 시클리무스(라파마이신) 및 마이코페놀레이트 모페틸(MMF)로 이루어졌다.

[0587] 성체 레서스 마카크(N=9, 6마리 수컷 및 3마리 암컷, 그룹 2 내지 4)에 영상-유도된 후두하 천자에 의해 1×10^{12} 또는 10^{13} 개의 총 GC AAV9.hIDUA의 1회 용량을 투여하였다. 추가의 수컷 동물(그룹 1)에 영상-유도된 후두하 천자에 의해 비히클(엘리트 B(등록상표) + 0.001% 플루로닉(등록상표) F68)의 1회 용량을 투여하였다. 본 실시예의 A부분의 연구와 일치하게, 투여 절차에 관한 AE가 존재하고, 일반적인 임상적 관찰, 체중 변화, CBC, 플라즈마 화학법, 또는 응고 매개변수에 대한 치료-관련 효과는 없었다. IS는 주로 체중 및 CBC에 대한 영향을 갖는다.

[0588] AAV 벡터 계층은 모든 AAV9.hIDUA 검사 벡터-치료 동물의 뇌, 척수, 및 배근 신경절 전반에서 검출되었다. 모든, 하지만 1마리의 AAV9.hIDUA 검사 벡터 치료 동물은 hIDUA에 대하여 체액성 및 T-세포 면역 반응을 모두 발달시켰으며, 이것은 용량-의존적은 아니다. IS는 hIDUA에 대한 체액성 면역 반응만을 방지한다. IS는 IS 동물의 2/3에서 제60 일 내지 제90 일에 발생한 hIDUA 또는 AAV9 캡시드에 대한 세포 면역 반응을 방지하지 않는다. 치료-관련 결과는 조직학적 분석에서 관찰되지 않았고 최소 내지 경증의 척수 배주 축삭병으로 이루어지며 이것은 용량 의존적이지 않다. 배주에서 돌출된 뉴런 세포체를 포함하는 배근 신경절에서, 단핵구 세포 침윤과 함께 최소 내지 중등증 뉴런 세포체 변성이 존재한다. AAV9.hIDUA의 용량 수준은 척수 및 배근 신경절에서의 결과의 존재 및 강도에 영향을 미치지 않았다. IS는 IS를 받은 대부분의 동물에서 축삭병을 제거하지 않았다.

[0589] 이들 데이터는 MPS I의 CNS 징후를 반전시키기 위한 AAV9.hIDUA의 IC 투여의 잠재적 효능을 지지하지만, 최적의 효능 및 안전성을 달성하기 위한 임상 환경에 IS가 또한 필요할 수 있다는 것을 시사한다.

[0590] DRG 신경원 변성, hIDUA를 발현하는 감각 뉴런 주위의 T- 및 B- 림프구 침윤, 및 hIDUA에 대한 체액성 및 T-세포 면역 반응의 관찰된 결과에 기반하여, 배근 신경절에서 형질도입된 감각 뉴런의 작은 일부의 면역-매개된 파괴가 손상된 DRG 뉴런을 따라 축삭 돌기의 변성(줄기마름 현상)에 의해 최소-내지-경증의 배주 축삭병을 유도한다고 결론을 내릴 수 있다.

[0591] DRG 신경원 변성 및 배주 축삭병의 결과는 저용량(1×10^{12} 개의 GC) 및 고용량(1×10^{13} 개의 GC) 그룹에서 유사한 발병률 및 중증도로 존재하였다. 이 발견에 기반하여, NOAEL은 AAV9.hIDUA 검사 벡터로 IT 주사된 레서스 마카크에서 정의될 수 없다. 결과의 발병률 및 중증도는 고용량(1×10^{13} 개의 GC) IS 그룹에서 감소되었으며, 이 결과의 원인은 면역 관련된 것이다.

[0592] C. 연구 요약 및 결론

[0593] 이들 데이터는 DRG 뉴런의 면역-매개된 파괴가 축삭병을 야기할 수 있다는 것을 보여준다. 뉴런 주변 염증 침윤은 hIDUA 및 뉴런 사멸을 발현하는 경수 뉴런 주위에서 관찰되었다. 경증 내지 중등증 축삭병은 DRG로부터 유래된 상행 축삭 돌기를 포함하는 후삭에서 관찰되었다. 비정상적인 결과를 나타내는 동물은 모두 이식유전자 산물에 대하여 체액성 및 T 세포 반응을 나타낸다. 동물은 연구 전반에 걸쳐 임상적으로 정상이었다. 사용된 면역 억제 요법(MMF+시클리무스)은 약화되었지만 이식유전자에 대한 면역 반응을 지속적으로 방지하지 못했다. 축삭병과 항-AAV9 반응 간의 연관성은 관찰되지 않았다. 이로부터, AAV9.hIDUA를 이용하는 초기 연구에서 뉴런 세포

에 대한 면역 매개된 손상의 위험을 최소화하기 위해 면역 억제제가 요구된다는 결론 내려진다. 결론적으로, 전임상 연구는 MPS I(AAV9.hIDUA)에서 신경인지 증상을 해결하기 위한 IT AAV9 기반 유전자 요법이 개발을 지원한다. 전임상 연구의 결과는 면역 매개된 독성의 위험을 최소화하기 위해 AAV9.hIDUA를 이용한 요법과 함께 면역 억제를 포함하는 것을 필요로 한다.

[0594] 실시예 8: rAAV9.CB7.hIDUA 벡터의 제조

[0595] (i) hIDUA 벡터 게놈 플라스미드, (ii) AAV rep2 및 cap 9 야생형 유전자를 함유하는 pAAV29로 칭해지는 AAV 헬퍼 플라스미드 및 (iii) pAdΔF6(Kan)으로 칭해지는 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드에 의한 인간 HEK293 MCB 세포의 삼중 플라스미드 형질감염에 의해 AAV9.CB7.hIDUA를 생성한다. 패키징된 벡터 게놈의 크기는 4344nt이다.

[0596] 상기 플라스미드 pAAV.CV7.CI.hIDUAco.RGB의 클로닝; 플라스미드는 크기가 7,165bp이다. 이 플라스미드로부터 유래된 벡터 게놈은 hIDUA 발현 카세트에 측접하는 AAV2 유래 ITR을 갖는 단일 가닥 DNA 게놈이다. 이식유전자 카세트로부터의 발현은 CB7 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 급초기 인핸서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 사이의 혼성체에 의해 유도되는 한편, 이 프로모터로부터의 전사는 닭 베타 액틴 인트론(CI)의 존재에 의해 향상된다. 발현 카세트에 대한 폴리A 신호는 토끼 베타-글로빈(RBG) 폴리A이다. hIDUA 서열[서열번호 1]을 코돈-최적화 및 합성함으로써 플라스미드를 구성하고, 얻어진 작제물은, 이어서, 플라스미드 pENN.AAV.CB7.CI.RGB(p1044), 즉, CB7, CI 및 RBG 발현 요소를 함유하는 AV2 ITR-측접 발현 카세트 내로 클로닝되어 pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RGB(p3032)를 제공한다.

[0597] 시스 플라스미드 pAAV.CB7CIhIDUA.RGB.KanR의 클로닝:PacI 제한 효소를 이용하여 p3032로부터 벡터 게놈을 절단하고 나서, 카나마이신 내성 유전자를 함유하는 pKSS-기반 플라스미드 골격(p2017) 내로 클로닝하였다. 최종 벡터 게놈 플라스미드는 pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RGB.KanR이다.

[0598] AAV2/9 헬퍼 플라스미드 pAAV29KanRRep2

[0599] AAV2/9 헬퍼 플라스미드 pAAV29KanRRep2는 AAV9로부터 4 야생형 AAV2 rep 단백질 및 3 야생형 AAV VP 캡시드 단백질을 암호화한다. 키메라 패키징 작제물을 생성하기 위해, 처음에 야생형 AAV2 rep 및 cap 유전자를 함유하는 플라스미드 p5E18로부터의 AAV2 cap 유전자를 제거하고 나서, 간 DNA로부터 증폭된 AAV9 cap 유전자의 PCR 단편으로 대체하였다. 얻어진 플라스미드에 식별자 pAAV2-9(p0008)를 제공하였다. rep 발현을 정상적으로 유도하는 AAV p5 프로모터는 이 작제물에서 rep의 5' 말단으로부터 cap의 3' 말단까지 이동된다는 것을 주목한다. 이 배열은 프로모터와 rep 유전자 사이에 스페이서를 도입하는 작용을 하며(즉, 플라스미드 골격), rep의 발현을 하향조절하고, 벡터 생성을 지지하는 능력을 증가시킨다. p5E18에서의 플라스미드 골격은 p5E18에서의 플라스미드 골격은 pBluescript KS로부터 유래된다. AAV2/9 헬퍼 플라스미드 pAAV29KanRRep2는 AAV9로부터 4 야생형 AAV2 rep 단백질 및 3 야생형 AAV VP 캡시드 단백질을 암호화한다.

[0600] pAdDeltaF6(Kan) 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드는 크기가 15,770 bp이다. 플라스미드는 AAV 복제에 중요한 아데노바이러스 게놈의 영역, 즉, E2A, E4 및 VA RNA를 함유하지만(아데노바이러스 E1 기능은 293 세포에 의해 제공됨), 다른 아데노바이러스 복제 또는 구조적 유전자를 함유하지 않는다. 플라스미드는 복제에 중요한 시스 요소, 예컨대 아데노바이러스 반전 말단 반복부를 함유하지 않으며, 따라서, 감염성 아데노바이러스가 생성될 것으로 예상되지 않는다. 이는 Ad5의 E1, E3 결실 분자 클론(pBHG10, pBR322 기반 플라스미드)으로부터 유래되었다. 결실이 Ad5 DNA에 도입되어 불필요한 아데노바이러스 유전자의 발현을 제거하고, 32Kb 내지 12kb의 아데노바이러스 DNA의 양을 감소시킨다. 최종적으로, 암호화된 내성 유전자는 카나마이신 내성 유전자에 의해 대체되어 pAdΔF6를 제공한다. AAV 벡터 생성에 필요한 E2, E4 및 VAI 아데노바이러스 유전자의 기능성 요소는 이 플라스미드에 남아있다. 아데노바이러스의 E1 필수 유전자 기능은 HEK293 세포에 의해 공급된다. DNA 플라스미드 서열분석은 쿼아젠 게놈 서비스(Qiagen Genomic Services)에 의해 수행되었고 다음의 기능성 요소 기준 서열 pAdDeltaF6(Kan) p1707FH-Q: E4 ORF6 3692-2808 bp; E2A DNA 결합 단백질 11784-10194 bp; VA RNA 영역 12426-13378 bp와 100% 상동성을 나타내었다.

[0601] 제조 과정을 요약하는 흐름도를 도 11에서 제공한다.

[0602] 세포 파종: 생산 과정을 위한 자격이 부여된 인간 배아 신장 293 세포주를 사용할 것이다. 세포는 코닝(Corning) T-플라스크 및 CS-10을 이용하여 5 x 10⁹ 내지 5 x 10¹⁰개의 세포로 확장되는데, 이는 BDS 로트마다의 벡터 생성을 위한 50 HS-36까지의 파종을 위해 충분한 세포 질량이 생성되는 것을 허용할 것이다. 10% 감마 조사(irradiated), US-공급원의, 소태아 혈청(FBS)으로 보충한 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified

Eagle Medium: DMEM)로 구성된 배지에서 세포를 배양시켰다. 세포는 앵커리지(anchorage) 의존적이며, TrypLE 셀렉트(Select), 동물 무 생성물(product-free) 세포 해리 시약을 이용하여 세포 분리를 수행할 것이다. 멸균, 일회용 생물공정 백 및 관 세트를 이용하여 세포 파종을 수행한다. 세포를 37℃(± 2℃)로 5%(± 0.5%) CO2 대기에서 유지할 것이다. 세포 배양물 배지를 신선한, 무 혈청 DMEM 배지로 대체하고 나서, 최적화된 PEI-기반 형질도입 방법을 이용하여 3개의 생성 플라스미드에 의해 형질감염시켰다. cGMP 제조: 소급성(traceability), 기록 제어 및 물질 분리의 가장 중요한 특징을 이용하여 CMO 품질 시스템 및 기반 시설과 관련하여 생성 공정에서 사용한 모든 플라스미드를 생산할 것이다.

[0603] 50 HS-36까지(BDS 배취마다) 형질감염시키기 위해 충분한 DNA 플라스미드 형질감염 복합체를 BSC에서 제조할 것이다. 초기에, 7.5 mg의 pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RBG.KanR 벡터 계놈 플라스미드, 150 mg의 pAdDeltaF6(Kan), 75 mg의 pAAV29KanRRep2 AAV 헬퍼 플라스미드 및 GMP 등급 PEI(PEIPro, PolyPlus 형질감염 SA)를 함유하는 DNA/PEI 혼합물을 제조할 것이다. 이 플라스미드 비는 소규모 최적화 연구에서 AAV 생성에 대해 최적의 것으로 결정되었다. 웰을 혼합한 후에, 용액을 실온에서 25분 동안 두고, 이어서, 반응을 중단시키기 위해 무혈청 배지에 첨가한 다음, HS-36에 첨가하였다. 형질감염 혼합물은 HS-36의 모두 36개 층 사이에서 동등하게 되며, 세포를 5일 동안 5%(± 0.5%) CO2 분위기에서 37℃(±2℃)에서 인큐베이션시킨다.

[0604] 세포 배지 채취: 유닛 밖으로 배지를 멸균 배수시킴으로써 일회용 생물공정 백을 이용하여 각각의 HS-36으로부터 형질감염 세포 및 배지를 채취할 것이다. 배지의 채취 후에, 대략 80-리터 용적을 MgCl2를 이용하여 2mM의 최종 농도까지(벤조나제에 대한 보조요소) 보충할 것이고, 벤조나제 뉴클레아제(카탈로그 번호: 1.016797.0001, 머크(Merck) 그룹)를 최종 농도 25 유닛/mL로 첨가할 것이다. (일회용 생물공정 백 내) 생성물을 인큐베이터에서 37℃로 2시간 동안 인큐베이션시켜 형질감염 절차의 결과로서 채취물 중에 존재하는 잔여 세포 및 플라스미드 DNA의 효소 분해를 위한 충분한 시간을 제공할 것이다. 최종 벡터 내 잔여 DNA 양을 최소화하기 위해 이 단계를 수행한다. 인큐베이션 기간 후에, 여과 그리고 하류의 접선 유동 여과 동안 생성물의 회수를 돕기 위해 500mM의 최종 농도에 NaCl을 첨가할 것이다(이하의 단계 4 및 5 참조).

[0605] 정화: 연동펌프에 의해 구동되는 멸균의, 폐쇄 관 및 백 세트로서 직렬로 연결되는 뎀스 필터(depth filter) 캡슐(1.2um/0.22um)을 이용하여 생성물로부터 세포 및 세포 파편을 제거할 것이다. 정화는 하류의 필터 및 크로마토그래피 칼럼이 파울링으로부터 보호된다는 것을 보장하며, 바이오버든(bioburden) 감소 여과는 필터 무리의 단부에서 상류 생성 공정 동안 도입된 임의의 바이오버든이 하류의 정제 전에 제거된다는 것을 보장한다. 채취 물질은 사르토리우스 사르토가드(Sartorius Sartoguard) PES 캡슐 필터(1.2/0.22um)(사르토리우스 스테딤 바이오테크 인코포레이티드(Sartorius Stedim Biotech Inc.))를 통과할 것이다.

[0606] 대규모 접선 유동 여과: 정화 생성물의 용적 감소(10배)는 커스텀 멸균, 폐쇄 생물가공 관, 백 및 막 세트를 이용하여 접선 유동 여과(TFF)에 의해 달성할 것이다. TFF의 원칙은 적합한 다공성(100kDa)의 막과 병행하여 압력 하에 용액을 유동시키는 것이다. 압력 차이는 막을 통해 그리고 폐기물 스트림 내로 효과적으로 더 작은 크기의 분자를 공급하는 한편, 막 기공보다 더 큰 분자를 보유한다. 용액을 재순환시킴으로써, 병행 흐름은 막 표면을 스쳐서 막 기공 파울링을 방지한다. 적절한 막 기공 크기 및 표면적을 선택함으로써, 액체 샘플은 용적이 빠르게 감소될 수 있는 한편, 목적으로 하는 분자를 유지하고 농축시킨다. TFF 적용의 정용여과는 액체가 막을 통해 그리고 폐기물 스트림으로 통과하는 것과 동일한 속력으로 재순환 샘플에 대한 신선한 완충제의 첨가를 수반한다. 정용여과 용적을 증가시켜서, 증가하는 양의 소분자를 재순환 샘플로부터 제거한다. 이는 정화된 생성물의 보통의 정제를 초래하지만, 또한 후속의 친화도 칼럼 크로마토그래피 단계에 적합한 완충제 교환을 달성한다. 따라서, 본 발명자들은 농축을 위해 100 kDa, PES 막을 이용하고, 이어서, 20mM 트리스 pH 7.5 및 400mM NaCl로 구성된 4 용적의 완충제를 이용하여 정용여과시킨다. 정용여과 생성물을 밤새 4℃에서 저장하고, 이어서, 1.2um/0.22um 뎀스 필터 캡슐을 이용하여 추가로 정화하여 임의의 침전 물질을 제거할 것이다.

[0607] 친화도 크로마토그래피:정용여과 산물은 AAV2/9 혈청형을 효율적으로 포획하는 캡처 셀렉트(Capture Select)(상표명) 포로스-AAV2/9 친화도 수지(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 적용할 것이다. 이들 이온성 조건 하에서, 잔여 세포 DNA 및 단백질의 상당한 백분율은 칼럼을 통해 유동하는 한편, AAV 입자는 효율적으로 포획된다. 적용 후에, 칼럼을 세척하여 추가적인 공급 불순물을 제거한 다음 낮은 pH 단계 용리시키고(400mM NaCl, 20mM 시트르산 나트륨; pH 2.5), 이를 1/10 용적의 중화 완충제(비스 트리스 프로판, 200mM, pH 10.2) 내로 수집에 의해 즉시 중화시킨다.

[0608] 음이온 교환 크로마토그래피: 비어있는 AAV 입자를 포함하는 제조 과정의 불순물의 추가적인 감소를 달성하기 위해, 포로스(Poros)-AAV2/9 용리 풀을 50배 희석시켜(20mM 비스 트리스 프로판, 0.001% 플루로닉 F68; pH

10.2) CIMultus Q 모놀리스 매트릭스(CIMultus Q monolith matrix)(BIA 세퍼레이션즈(BIA Separations))에 대한 결합을 가능하게 하는 이온 강도를 감소시킨다. 저염 세척 후에, 60 CV NaCl 선형 염 구배(10 내지 180mM NaCl)를 이용하여 벡터 생성물을 용리시킨다. 이 얇은 염 구배는 벡터 게놈을 함유하는 입자(전체 입자)로부터 벡터 게놈(비어있는 입자) 없이 캡시드 입자를 효과적으로 분리시키고 완전한 캡시드가 풍부한 제제를 생성하였다. 0.1% 플루로닉 F68의 1/100 용적 및 비스 트리스 pH 6.3의 1/27 용적을 함유하는 관 내로 분획을 수집하여 관에 대한 비-특이적 결합 및 높은 pH에 대한 노출 길이를 각각 최소화할 것이다. 적절한 피크 분획을 수집하고, 피크 면적을 평가하고 나서, 대략의 벡터 수율의 결정을 위해 이전의 데이터와 비교하였다.

[0609] BDS를 수득하기 위한 최종 제형 및 멸균 여과: 100 kDa 막을 이용하여 폴링한 AEX 분획 상에서 최종 제형을 달성하기 위해 TFF를 사용할 것이다. 4 용적의 제형 완충제(엘리엇 B 용액, 0.001% 플루로닉 F68)를 이용하는 정용여과에 의해 이를 달성하고 나서 BDS를 수득하기 위해 농축시킴으로써, 5 x 10¹³개의 GC/mL 이상의 역가를 달성하기 위한 농도 요인을 추정하기 위해 음이온 교환 크로마토그래피로부터의 피크 면적을 이전의 데이터와 비교할 것이다. BDS 시험에 대해 샘플을 제거할 것이다(이하의 부문에 기재). 여과시킨 정제 벌크를 멸균 폴리프로필렌 관에 저장하고 나서, 최종 충전물에 대한 방출까지 격리 위치에서 -60℃ 이하로 냉동시킨다. 예비 안정성 연구는 DP가 본 발명자들이 제안한 제형 완충제에서 냉동 및 해동 후 활성을 상실하지 않는다는 것을 나타낸다. -80℃에서 장기간 저장 후 안정성을 평가하기 위해 추가적인 연구가 진행 중이다.

[0610] 최종 충전물: 냉동 BDS 해동시키고, 폴링시킨 다음, 최종 제형 완충제를 이용하여 표적 역가로 희석시키고, 0.22μm 필터(매사추세츠주 빌러리카에 소재한 밀리포어(Millipore))를 통해 최종적으로 여과시키고 나서, 웨스트 파마슈티칼(West Pharmaceutical)의 "바로 사용 가능한"(사전 멸균시킨) 2mL 유리 바이알 내에 채우고 바이알 당 0.6mL 내지 2.0mL의 충전 용적에서 13mm 마개로 밀봉한다. 개개로 라벨링한 바이알을 이하의 사항에 따라 라벨링할 것이다. 라벨링한 바이알을 -60℃ 이하에서 저장한다.

[0611] 벡터(약물 제품)를 단일 고정 농도에서 바이알에 넣을 것이고, 유일한 변수는 바이알 당 용적일 것이다. 더 낮은 용량 농도를 달성하기 위해, 약물 제품을 엘리엇 B 용액, 0.001% 플루로닉 F68로 희석시킬 것이다. 희석 없이 고용량 벡터를 직접 사용하는 한편, 낮은 벡터는 투약 시 약국에서 수행될 제형 완충제 중의 1.5배 희석을 필요로 할 것이다.

[0612] 실시예 9: 벡터의 검사

[0613] 혈청형 정제, 비어있는 입자 내용물 및 이식유전자 산물 정제를 포함하는 특성규명 분석을 수행한다. 분석의 설명을 이하에 나타낸다.

[0614] A. 벡터 게놈 정제: DNA 서열분석

[0615] 바이러스 벡터 게놈 DNA를 단리시키고 나서, 프라이머 워킹(primer walking)을 이용하는 2배 서열분석 적용범위에 의해 서열을 결정하였다. 서열 정렬을 수행하고 나서, 예상되는 서열과 비교할 것이다.

[0616] B. 벡터 캡시드 정제: 질량 분석법(MS)에 의한 VP3 캡시드 단백질의 펩타이드 분석에 기반한 분석에 의해 벡터의 AAV2/9 혈청형의 VP3 확인의 AAV 캡시드 질량 분석을 달성한다. 상기 방법은 SDS-PAGE 겔로부터 절단된 VP3 단백질 밴드의 다중-효소 분해(트립신, 키모트립신 및 엔도프로테아나제 Glu-C) 다음에 UPLC-MS/MS on 캡시드 단백질을 서열분석하기 위한 큐-이그잭티브 오비트랩(Q-Exactive Orbitrap) 질량 분석계 상의 특성규명을 수반한다. 숙주 단백질 산물의 차감을 허용하고 질량 스펙트럼으로부터의 캡시드 펩타이드 서열을 유도하는 탠덤 질량 스펙트럼(MS) 방법을 개발하였다.

[0617] C. 게놈 복제물(GC) 역가

[0618] 다양한 연속 희석물에 대해 oqPCR 기반 게놈 복제물 역가를 결정하고, 동족 플라스미드 표준(pAAV.CB7.CI.hIDUAco.RBG.KanR)과 비교할 것이다. oqPCR 분석은 DNase I 및 프로테아나제 K에 의한 순차적 분해, 다음에 qPCR 분석을 이용하여 캡시드화된 벡터 게놈 복제물을 측정한다. 동일한 영역에 혼성화하는 형광 태그된 프로브와 조합된 RBG 폴리A 영역을 표적화하는 서열 특이적 프라이머를 이용하여 DNA 검출을 수행할 것이다. 플라스미드 DNA 표준 곡선에 대한 비교는 임의의 PCR 후 샘플 조작의 필요 없이 역가 결정을 허용한다. 다수의 표준, 검증 샘플 및 대조군을 (배경 및 DNA 오염에 대해) 분석에 도입하였다. 이 분석은 현재 자격은 없지만, CMO에 의해 자격이 부여될 것이다. 분석은 민감도, 검출 한계, 자격 범위 및 분석내 및 분석간 정확도를 포함하는 분석 매개변수를 확립하고 정함으로써 자격이 부여 될 것이다. 내부 AAV9 기준 로트를 확립하고 나서, 자격 연구를 수행하기 위해 사용할 것이다. 본 발명자들의 이전의 경험은 본 명세서에 기재된 최적화된 qPCR 분석에 의해 얻어진 역가가 일반적으로 전임상 데이터의 생성을 위해 사용되는 본 발명자들의 표준 qPCR 기법에

의해 달성되는 것보다 일반적으로 2.5배 더 높다는 것을 시사한다는 것을 주목한다.

[0619] D. 비어 있는 입자 대 차 있는 입자 비

[0620] 약물 제품의 총 입자 함량을 SDS-PAGE 분석에 의해 결정할 것이다. 이오덕사놀 구배에 대해 정제된 기준 벡터 제제는 제제가 95% 초과인 게놈-함유(전체) 입자를 함유한다는 것을 확립하기 위해 다양한 방법(분석적 초원심 분리, 전자현미경 및 260/280nm에서의 흡광도)에 의해 분석한다. 이 기준 물질은 알려진 게놈 복제물 수(그에 따라 더 나아가 입자수)로 연속회석시키고, 약물 제품의 유사한 연속 회석에 따라 SDS PAGE 겔 상에서 각각의 회석을 실행한다. 기준 물질과 약물 제품 VP3 단백질 밴드 둘 다의 최대 면적 용적을 농도 계측에 의해 결정하고, 기준 물질 용적을 입자 수에 대해 플롯팅한다. 약물 제품의 총 입자 농도를 이 곡선으로부터의 외삽에 의해 결정하고 나서, 이어서, 비어있는 입자 역가를 얻기 위해 게놈 복제물(GC) 역가를 차감한다. 비어 있는 입자 대 차 있는 입자 비는 비어 있는 입자 역가 대 GC 역가의 비이다.

[0621] E. 감염성 역가

[0622] RC32 세포(rep2 발현 HeLa 세포) 내 벡터의 생산적 흡수 및 복제를 결정하기 위해 감염 단위(infectious unit: IU) 분석을 사용한다. 이전에 공개된 것과 유사하게 96-웰 종말점 형식을 사용하였다. 간략하게, RC32 세포를 rAAV9.CB.hIDUA의 연속 회석 및 rAAV의 각각의 회석에서 12개 복제물에 의한 Ad5의 균일 회석에 의해 공동 감염시킨다. 감염 후 72시간에 세포를 용해시키고, 유입에 따른 rAAV 벡터 증폭을 검출하기 위해 qPCR을 수행하였다. 종말점 회석 TCID50 계산(스피어만-카버(Spearman-Kärber))을 수행하여 IU/mL로서 표현되는 복제 역가를 결정한다. "감염도" 값은 세포와 접촉하게 되는 입자, 수용체 결합, 내재화, 핵 및 게놈 복제에 대한 수송에 의존하기 때문에, 그들은 분석 기하학 및 적절한 수용체의 존재 및 사용되는 세포주의 결합 후 경로에 의해 영향 받는다. 수용체 및 결합 후 경로는 보통 불멸 세포주에서 유지되지 않으며, 따라서 감염도 분석 역가는 존재하는 "감염성" 입자 수의 절대 측정이 아니다. 그러나, 캡슐화된 GC 대 "감염 단위"의 비(GC/IU 비로서 기재)는 로트에 따라 제품 일관성의 측정으로서 사용할 수 있다.

[0623] GC/IU 비는 제품 일관성의 측정이다. oqPCR 역가(GC/mL)를 "감염 단위"(IU/mL)로 나누어서 계산된 GC/IU 비를 제공한다.

[0624] F. 복제-적격 AAV(rcAAV) 분석

[0625] 생산 공정 동안 잠재적으로 일어날 수 있는 복제 적격 AAV2/9(rcAAV)의 존재에 대해 샘플을 분석할 것이다. 세포 기반 증폭 및 계대 후에 실시간 qPCR에 의한 rcAAV DNA의 검출(cap 9 표적)로 이루어진 3 계대 분석을 진행하였다. 세포-기반 성분은 시험 샘플의 회석물 및 5형 야생형 인간 아데노바이러스(Ad5)로 HEK293 세포(P1)의 단일층을 접촉하는 것으로 이루어진다. 벡터 제품의 10^{10} GC는 시험한 제품의 최대 양일 수 있다. 아데노바이러스의 존재에 기인하여, 복제 적격 AAV를 세포 배양물에서 증폭시킬 것이다. 2일 후에, 세포 용해물을 생성하고, Ad5를 열 비활성화시킨다. 이어서, 정화된 용해물을 세포의 제2 라운드(P2)로 계대시켜 (다시 Ad5의 존재 하에서) 민감도를 향상시킨다. 2일 후에, 세포 용해물을 생성하고, Ad5를 열 비활성화시킨다. 이어서, 정화된 용해물을 세포의 제3 라운드(P3)로 계대시켜 (다시 Ad5의 존재 하에서) 민감도를 최대화한다. 2일 후에, DNA를 풀기 위해 세포를 용해시키고, 이어서 qPCR을 실시하여 AAV9 cap 서열을 검출한다. Ad5 의존적 방식으로 AAV9 cap 서열의 증폭은 rcAAV의 존재를 나타낸다. AAV2 rep 및 AAV9 cap 유전자를 함유하는 AAV2/9 대용 양성 대조군의 사용은 결정될 분석의 검출 한계(LOD)(0.1, 1, 10 및 100 IU)를 가능하게 하며 rAAV9.CB7.hIDUA 벡터(1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 개의 GC)의 연속 회석을 이용하여 시험 샘플 중에 존재하는 rcAAV의 대략의 수준을 정량화할 수 있다.

[0626] G. 시험관내 효능

[0627] 세포 당 GC의 알려진 다중도로 Huh7 또는 HEK293 세포를 형질도입함으로써 그리고 형질도입 후 72시간에 IDUA 활성화에 대해 상층액을 분석함으로써 qPCR GC 역가를 유전자 발현과 관련짓기 위해, 시험관내 생체분석을 수행할 것이다. 37도에서 1 내지 3시간 동안 0.1mL 물 중에서 회석시킨 샘플을 0.1mL의 100mmol/L 4MU-이두로나이드와 함께 인큐베이션시킴으로써 IDUA 활성을 측정한다. 2mL 290mmol/L 글리신, 180mmol/L 시트르산나트륨, pH 10.9의 첨가에 의해 반응을 중단시키고 나서, 형광을 4MU의 표준 회석물과 비교함으로써 유리된 4MU를 정량화한다. 고도로 활성인 전임상과 tox 벡터 제제의 비교는 제품 활성화의 이해를 가능하게 할 것이다.

[0628] H. 총 단백질, 캡시드 단백질, 단백질 순도 결정 및 캡시드 단백질 비

- [0629] 바이신코닉산(bicinchoninic acid: BCA) 분석을 이용하여 소 혈청 알부민(BSA) 단백질 표준 곡선에 대한 총 단백질에 대해 백터 샘플을 처음 정량화한다. 동일 부분의 샘플을 키트에 제공된 마이크로-BCA 시약과 혼합함으로써 결정하였다. BSA 표준의 희석물에 동일한 절차를 적용한다. 혼합물을 60℃에서 인큐베이션시키고, 흡광도를 562nm에서 측정한다. 알려진 농도의 표준 흡광도로부터 4-모수 적합도를 이용하여 표준 곡선을 생성한다. 4-모수 회귀에 따라 알려지지 않은 샘플을 정량화한다.
- [0630] AAV 순도의 준-정량적 결정을 제공하기 위해, 이어서, 샘플을 게놈 역가에 대해 정규화하고, 5×10^9 개의 GC를 환원 조건 하에서 SDS-폴리아크릴아마이드(SDS-PAGE) 겔 상에서 분리시켰다. 이어서, 겔을 SYPRO 루비 염료로 염색한다. 25, 50 및 100ng의 단백질/레인의 공동 전기이동 BSA 표준에 대한 비교에 의한 농도계측에 의해 임의의 불순물 밴드를 정량화한다. 이들 정량화는 1%, 2% 및 4%의 총 AAV 단백질 샘플을 나타낸다. 3가지 AAV 특이적 단백질 VP1, VP2 및 VP3에 추가로 나타난 염색 밴드는 단백질 불순물로 고려한다. 모든 불순물 밴드를 기준 단백질과 비교하고, 불순물 질량%뿐만 아니라 대략의 분자량을 보고한다. 또한 SDS-PAGE 겔을 사용하여 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 정량화하고, 그들의 비를 결정한다.
- [0631] 실시예 10: 생체내 분포 및 뇌 효소
- [0632] 성인 사이노물거스 마카크에 1×10^{12} 개의 GC/kg AAV9.CMV.hIDUA로 후두골로 주사한다. 636일 후에, 조직을 채취하고 나서, -80℃ 이하로 즉시 냉동시킨다. QIAamp DNA 미니 키트(키아젠(Qiagen)), 미국 캘리포니아주 발렌시아에 소재)를 이용하여 조직으로부터 총 세포의 DNA를 추출한다. 실시간 PCR(택맨 유니버설 마스터 믹스(TaqMan Universal Master Mix), 미국 캘리포니아주 포스터 시티에 소재한 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))에 의해 추출된 DNA에서 백터 게놈의 검출 및 정량화를 수행하고, 프로브 세트를 SV40 폴리A 내의 서열에 대해 표적화한다. PCR 조건은 각각 주형으로서 100ng 총 세포 DNA, 300nM 프라이머, 및 200nM 프로브로 설정한다. 주기는 95.8℃에서 10분, 95.8℃에서 15s의 40주기, 및 60.8℃에서 1분이다.
- [0633] 성체 MPS I 넉아웃 마우스는 3×10^8 , 3×10^9 , 또는 3×10^{10} 개의 GC/마우스 AAV9.CB7.hIDUA를 우측 측면 뇌실 내로 주사한다. 21일 후에, 전체 뇌를 채취하고 나서, -80℃ 이하로 즉시 냉동시킨다. 조직 샘플을 용해 완충제(0.2% 트리톤-X100, 0.9% NaCl, pH 4.0) 중에서 균질화시키고, 간단하게 초음파 처리한다. 이어서, 샘플을 냉동-해동시키고, 원심분리에 의해 정화시킨다. BCA 분석에 의해 단백질 농도를 결정한다. 37℃에서 1 내지 3시간 동안 0.1mL 물 중에서 희석시킨 샘플을 IDUA 완충제(0.15 mol/l NaCl, 0.05% 트리톤-X100, 0.1mol/l 아세트산나트륨, pH 3.58) 중의 0.1mL의 100mmol/l 4MU-이두로나이드(캐나다 토론토에 소재한 토론토 리서치 케미칼스(Toronto Research Chemicals); 영국 워링턴에 소재한 글리코신스(Glycosynth))와 함께 인큐베이션시킴으로써 IDUA 활성을 측정한다. 2mL 290mmol/l 글리신, 180mmol/l 시트르산나트륨, pH 10.9의 첨가에 의해 반응을 중단시킨다. 형광을 4MU의 표준 희석물과 비교함으로써 유리된 4MU를 정량화한다. 유리된 nmol 4MU/시간/mg의 단백질로서 단위를 제공한다.
- [0634] 실시예 11: MPSI 바이오마커
- [0635] 본 연구에서, MPS I 개로부터의 CSF 샘플의 대사물질 프로파일링을 수행하였고, 이는 CSF 대사체에서 실질 질환 관련 변화를 나타내었다. 가장 현저한 차이는 정상 대조군에 비해 스퍼민 수준에서 30배 이상의 상승이 있었다. 이 발견은 MPS I 환자 샘플뿐만 아니라 MPS I의 고양이 모델에서 확인하였다. 스퍼민은 HS에 결합하고, 스퍼민의 세포 흡수는 이 상호작용에 의존한다[M. Belting, S. Persson, L.-ÅA. Fransson, Proteoglycan involvement in polyamine uptake. Biochemical Journal 338, 317-323 (1999); J. E. Welch, P. Bengtson, K. Svensson, A. Wittrup, G. J. Jenniskens, G. B. Ten Dam, T. H. Van Kuppevelt, M. Belting, Single chain fragment anti-heparan sulfate antibody targets the polyamine transport system and attenuates polyamine-dependent cell proliferation. International journal of oncology 32, 749-756 (2008); published online EpubApr]. 세포 표면 프로테오글리칸, 예컨대 글리피칸-1은 그들의 HS 모이어티를 통해 스퍼민에 결합할 수 있고, 글리피칸 단백질의 내포작용 후에, HS 쇄의 세포내 절단은 결합된 스퍼민을 세포 내로 방출한다(K. Ding, S et al, The Journal of biological chemistry 276, 46779-46791 (2001); 온라인 공개 EpubDec 14. 따라서, 무손상 HS 재순환은 스퍼민 흡수에 필수적이다. MPS I에서, 세포외 스퍼민 축적은 불충분한 HS 재순환에 기인하는 이 흡수 메커니즘의 저해를 통해, 또는 MPS에서 축적되는 세포외 GAG에 대한 스퍼민의 단순한 결합을 통해 발생되어, 세포외 분포에 바람직한 스퍼민 결합 평형상태로 이동한다. 추가적인 연구는 MPS I CSF 내 스퍼민 축적에 대한 이들 메커니즘의 상대적 기여를 처리하여야 한다.
- [0636] 본 발명자들은 스퍼민 합성의 저해제가 MPS 뉴런 내 과량의 신경돌기 성장을 차단한다는 것과 신경돌기 성장이

환자 CSF에서 발견되는 것과 유사한 스퍼민 농도에 의해 WT 뉴런에서 유도될 수 있었다는 것을 발견하였다. MPS I의 개 모델에서의 유전자 요법은 스퍼민 축적을 반전시키고, GAP43의 발현을 정상화시키는데, 이는 동일한 경로가 생체내에서 영향을 미친다는 것을 시사한다. 이용 가능한 저해제가 혈액-뇌 장벽을 가로지르지 않고, 출생 시로부터 만성 직접 CNS 투여가 본 발명자들의 모델에서 실현 가능하지 않기 때문에, 본 발명자들은 생체내 스퍼민 합성 저해의 영향을 직접적으로 평가할 수 없었다. 본 발명자들의 시험관내 발견은 MPS I에서 비정상적 신경돌기 성장에서 스퍼민에 대한 역할을 뒷받침하며, 이는 스퍼민 합성을 저해하는 것이 표현형을 완전히 반전시키지 않고, 정상 뉴런에 대한 스퍼민 첨가는 MPS I 뉴런의 수준으로 신경돌기 성장을 증가시키지 않았다는 것을 주목하는 데 중요하다. 스퍼민 조절의 효과는 상대적으로 짧은 치료 기간에 의해 제한될 수 있다. 또한 스퍼민 축적은 MPS I에서 신경돌기 증식에 기여하는 유일한 매개체가 아닐 가능성이 있다 특히 다수의 신경영양 인자는 HS 변형 수용체를 통해 결합하며, 세포외 기질 내 HS와의 상호작용은 신경돌기 성장에 영향을 미칠 수 있다[D. Van Vactor, et al, Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. Current opinion in neurobiology 16, 40-51 (2006); 온라인 공개 EpubFeb (10.1016/j.conb.2006.01.011)]. 따라서 스퍼민 축적은 MPS I에서 비정상적 신경돌기 성장을 촉진시키는 몇몇 인자 중 하나일 수 있다.

[0637] 선별된 15마리의 MPS I 개 CSF 샘플 중에서, 한 마리만이 스퍼민 농도의 정상 범위 내로 떨어진다. 28일령에, 이는 본 연구에 포함된 가장 어린 동물이었다. 이 발견은 스퍼민 축적은 연령 의존적일 수 있다는 것을 나타낸다. 추가 연구는 MPS 환자에서 CSF 스퍼민 수준을 장기적으로 평가하여야 한다. 스퍼민이 MPS 환자에서 연령에 따라 증가된다면, 이는 인지 감소의 역학을 설명할 수 있는데, 대부분의 환자가 발달 지연 개시 전에 1 내지 2년의 정상 발달을 경험하기 때문이다.

[0638] 뉴런 성장을 변경시키는 대사물질의 축적을 촉발하는 손상된 HS 대사에 대한 가능성은 MPSI에서 효소 결핍과 정상 신경돌기 성장 간의 신규한 관계를 지적할 수 있는데, 이는 이들 장애와 관련된 인지 장애를 설명할 수 있다. 이들 발견은 또한 CSF 스퍼민이 MPSI에 대한 신규한 CNS-관련 요법의 약력학을 평가하기 위한 비침습적 바이오마커로서 유용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0639] 물질 및 방법:

[0640] 실험 설계: 본 연구는 초기에 건강한 대조군으로부터의 샘플에 비해 MPS I 환자 CSF 샘플에서 상당히 상이한 수준으로 존재한 대사물질을 검출하도록 설계하였다. 후속적으로 인간 샘플 내 후보 바이오마커를 평가하는 의도로, MPS IH를 갖는 어린이 및 건강한 대조군으로부터의 CSF 샘플의 제한된 이용 가능성에 기인하여, 더 큰 수로 이용 가능한 MPS I 개로부터의 CSF 샘플을 이용하여 초기 선별을 수행하였다. 분석을 위해 개개 비처리 MPS I 개로부터의 총 15개 CSF 샘플을 이용 가능하며, 추가 15개 샘플을 건강한 대조군으로부터 얻었다. 장애의 대사물질 선별에서 MPS I 개 CSF에서 상승된 스퍼민의 동정 후에, 스퍼민을 유전자 요법으로 치료한 MPS I 개 및 고양이로부터의 CSF 샘플에서뿐만 아니라 환자 샘플에서 회고적으로 측정하였다. 이들 분석을 위해 각각의 그룹에 포함된 대상체의 수를 샘플 이용 가능성에 의해 제한하고, 통계학적 고려사항에 기반하지 않았으며; 따라서 일부 경우에 통계학적 비교를 위한 수는 불충분하다. 시험관내 신경돌기 성장의 연구를 위해, 각각의 조건에 대해 자격이 되는 세포 수는 세포 당 아버(arbor) 길이, 신경돌기 수 또는 신경돌기 분지의 20% 차이를 검출하는데 조건 당 30개 초과 세포가 필요하다는 것을 나타내는 파일럿 실험에 기반하였다. 세포를 플레이팅하고 지정 약물로 처리한 후에, 웰을 코드화하고, 세포 영상의 획득 및 신경돌기 길이 및 분지의 수동 정량화를 맵검 검토자에 의해 수행하였다. 유사한 결과를 갖는 상이한 기질[챔버 슬라이드(시그마 S6815) 보다는 폴리-L-라이신(시그마(Sigma)) 코팅 조직 배양 플레이트] 야생형과 MPS 마우스 뉴런의 비교를 반복하였다. 유사한 결과를 갖는 기질을 둘 다 이용하여 스퍼민 첨가가 있는 그리고 스퍼민 첨가가 없는 야생형 뉴런의 비교를 4회 수행하였다. CSF 대사물질 프로파일링: 메타볼론(Metabolon)에 의해 CSF 대사물질 프로파일링을 수행하였다.

[0641] 가공까지 -80℃에서 샘플을 저장하였다. 마이크로랩 스타(MicroLab STAR)(등록상표) 시스템(해밀톤 컴퍼니(Hamilton Company))를 이용하여 샘플을 제조하였다. QC 목적을 위해 추출 과정에서 제1 단계 전에 회수 표준을 첨가하였다. 2분 동안 격렬한 진탕 하에 단백질을 메탄올로 침전시킨 후 원심분리시켰다. 얻어진 추출물을 5개의 분획으로 나누었다: 양이온 방식 전기분무 이온화를 이용하는 역상(RP)UPLC-MS/MS에 의한 분석을 위한 하나, 음이온 방식 전기분무 이온화를 이용하는 RP/UPLC-MS/MS에 의한 분석을 위한 하나, 음이온 방식 전기분무 이온화를 이용하는 친수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC)/UPLC-MS/MS에 의한 분석을 위한 하나, GC-MS에 의한 분석을 위한 하나, 및 하나의 샘플을 예비용으로 보존하였다. 유기 용매를 제거하기 위해 샘플을 터보바프(TurboVap)(등록상표)(자이마크(Zymark)) 상에 잠깐 두었다. LC를 위해, 분석을 위한 준비 전에 샘플을 질소 하에 밤새 저장하였다. GC를 위해, 분석을 위한 준비 전에 각각의 샘플을 밤새 진공 하에 건조시켰다.

- [0642] 플랫폼의 LC/MS 일부는 워터스 액유티(Waters ACQUITY) 초성능 액체 크로마토그래피(UPLC) 및 열 전기분무 이온화(HESI-II) 공급원과 접속되는 써모 사이언티픽 큐-이그잭티브(Thermo Scientific Q-Exactive) 고분해능/정확한 질량 분석계 및 35,000 질량 해상도에서 작동하는 오비트랩(Orbitrap) 질량 분석기를 기준으로 한다. 샘플 추출물을 건조시키고, 이어서 각각의 LC/MS 방법에 적합한 용액 중에서 재구성시켰다. 각각의 재구성 용매는 주사 및 크로마토그래피 일관성을 보장하기 위해 고정된 농도에서 일련의 표준을 함유하였다. RP 크로마토그래피를 위해, 산성 양이온 최적화 조건을 이용하여 하나의 분취액을 분석하고 염기성 음이온 최적화 조건을 이용하여 다른 하나를 분석하였다. 각각의 방법은 별개의 전용 칼럼(워터스 UPLC BEH C18-2.1x100mm, 1.7um)을 이용하였다. 산성 조건에서 재구성한 추출물은 0.1% 폼산을 함유하는 물 및 메탄올을 이용하여 구배 용리시켰다. 염기성 추출물은 유사하게 메탄올 및 물을 이용하여, 그러나 6.5mM 중탄산암모늄과 함께 용리시켰다. 10mM 폼산암모늄과 함께 물 및 아세트나이트릴로 이루어진 구배를 이용하여 HILIC 칼럼(워터스 UPLC BEH 아마이드 2.1x150mm, 1.7um)으로부터의 용리 후에 음이온화를 통해 3 분취액을 분석하였다. MS 분석은 동적 제위를 이용하여 MS와 데이터-의존적 MSn 스캔을 교대로 하였다. 스캔 범위는 방법 간에 약간 다르지만, 80 내지 1000 m/z를 아우른다.
- [0643] 비스트라이메틸-실릴트라이플루오로아세트아마이드를 이용하여 건조 질소 하에 유도체화되기 전에 최소 18시간 동안 진공 하에 GC-MS에 의한 분석을 위해 정한 샘플을 건조시켰다. 유도체화된 샘플을 운반 기체로서 헬륨을 이용하는 5% 다이페닐/95% 다이메틸 폴리실록산 융합 실리카 칼럼(20m x 0.18mm ID; 0.18um 필름 두께) 상에서 60℃ 내지 340℃의 온도 기울기로 17.5분 기간에 분리시켰다. 전자 충격 이온화(EI)를 이용하는 써모-피니건 트레이스(Thermo-Finnigan Trace) DSQ 속성-스캐닝 단일-사중극자 질량 분석계 상에서 샘플을 분석하고 나서, 단위 질량 분해능에서 작동시켰다. 스캔 범위는 50 내지 750 m/z였다.
- [0644] 몇몇 유형의 대조군을 실험 샘플과 함께 분석하였다: 데이터 세트 전체적으로 기술적 복제물로서 작용하는 소용적의 각각의 실험 샘플을 취함으로써 생성된 폴링된 기질 샘플; 공정 블랭크로서 작용하는 추출된 물 샘플; 및 내인성 화합물의 측정을 방해하지 않도록 주의 깊게 선택된 QC 표준의 각테일을 모든 분석 샘플 내에 첨가하여, 기기 성능 모니터링을 허용하고 크로마토그래피 정렬을 보조하였다. 질량 분석계 내로 주사 전에 각각의 샘플에 첨가한 표준에 대한 중앙값 상대 표준 편차(RSD)를 계산함으로써 기기 가변성을 결정하였다. 폴링한 100%의 기질 샘플 중에 존재하는 모든 내인성 대사물질(즉, 비-기기 표준)에 대해 중앙값 RSD를 계산함으로써 전반적 공정 가변성을 결정하였다. 주사 중에 균일하게 간격을 둔 QC 샘플을 이용하기 시작한 플랫폼에 걸쳐 실험 샘플을 무작위화하였다.
- [0645] 체류 시간, 분자량(m/z), 바람직한 부가물, 및 공급원 내 단편뿐만 아니라 관련된 MS 스펙트럼을 포함하고 메타볼론(Metabolon)에서 개발한 소프트웨어를 이용하는 품질 제어를 위한 외관 검사에 의해 관리된 화학적 표준 독립체의 기준 라이브러리에 대한 실험 샘플 내 이온 특징의 자동화된 비교에 의해 대사물질을 동정하였다. 공지된 화학적 독립체의 식별은 정제된 표준의 대사체학 라이브러리 독립체에 대한 비교에 기반하였다. 곡선하 면적 측정을 이용하여 피크를 정량화하였다. 각각의 실행일에 대해 중앙값만큼의 기기 일간 변동차로부터 초래되는 변화에 대한 교정을 위해 각각의 샘플 내 각각의 대사물질에 대한 원 면적 계수를 정규화하고, 따라서 각각의 실행에 대해 중앙값을 1.0으로 설정한다. 이는 샘플 간의 변화를 보존하였지만, 크게 상이한 원 피크 면적의 대사물질을 유사한 그래프 척도에 비교하도록 허용하였다. 상실 값은 정규화 후에 관찰된 최소값에 귀속시켰다.
- [0646] 정량적 MS 분석: CSF 샘플(50uL)을 스퍼민-d8 내부 표준(아이소사이언시스(IsoSciences))과 혼합하였다. 샘플을 4배 과량의 메탄올과 혼합함으로써 단백질을 제거하고 나서, 12,000 x g로 4℃에서 원심분리시켰다. 질소 스트림하에 상청액을 건조시키고, 이어서, 50 μL의 물 중에서 재현탁시켰다. 5 μL의 분취액에 LC-MS 분석을 실시하였다. 엑스브릿지(Xbridge)(등록상표) C18 칼럼(3.5um, 150 x 2.1 mm)을 구비한 워터스 액유티 UPLC 시스템(미국 매사추세츠주 밀퍼드에 소재한 워터스 코퍼레이션(Waters Corp.))을 이용하여 LC 분리를 수행하였다. 유속은 0.15mL/분이고, 용매 A는 0.1% 폼산이며, 용매 B는 0.1% 폼산과 함께 98/2 아세트나이트릴/H2O(v/v)이었다. 용리 조건은 다음과 같다: 0분에 2% B, 2분에 2% B, 5분에 60% B, 10분에 80% B, 11분에 98% B, 16분에 98% B, 17분에 2% B, 22분에 2% B, 칼럼 온도는 35℃임. 피니건(Finnigan) TSQ 퀀텀 울트라(Quantum Ultra) 분광계(캘리포니아주 새너제이에 소재한 써모 피셔(Thermo Fisher))를 사용하여 다음의 매개변수에 의해 양이온 방식으로 MS/MS 분석을 수행하였다: 4000V에서 분무 전압, 270℃에서 모세관 온도, 35 임의 단위에서 쉬스(sheath) 가스 압력, 2개의 임의의 단위에서 이온 스위프 가스 압력, 10개의 임의의 단위에서 보조 가스 압력, 200℃에서 증발기 온도, 50에서 튜브 렌즈 오프셋, 35에서 모세관 오프셋 및 0에서 스킴 오프셋. 다음의 이행을 모니터링하였다: 0.002 m/z의 스캔폭, 및 0.15 s의 스캔 시간으로 203.1/112.1(스퍼민); 211.1/120.1(스퍼민-d8).
- [0647] 동물 절차: 모든 동물 프로토콜을 펜실베이니아 유니버시티 실험 동물 운영 위원회에 의해 승인받았다. CSF 대

사물질 선별을 위해, 3 내지 26개월령의 정상 개에서, 그리고 1 내지 18개월령의 MPS I 개에서 후두골 천자에 의해 샘플을 수집하였다. MPS I 개 및 고양이에서 유전자 전달 연구를 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다(20, 22). 벡터 투여 6 내지 8개월 후에 CSF 샘플을 수집하였다. 마우스 피질 뉴런 실험을 위해, 1차 피질 뉴런 배양 물을 E18 IDUA^{-/-} 또는 IDUA^{+/+} 배아로부터 준비하였다.

[0648] 환자 샘플: CSF 대사물질 프로파일링: 각각의 대상체의 부모 또는 법정 후견인으로부터 받은 사전 동의서에 기재된 바와 같이(메타볼론 참조) 대사물질 프로파일링을 수행하였다. 미네소타 유니버시티의 생명윤리위원회에 의해 프로토콜을 승인받았다. 요추 천자에 의해 CSF를 수집하였다. 모든 MPS I 환자는 혈리 증후군의 진단을 받았지만, 샘플 수집 전에 효소 대체 요법 또는 조혈모세포 세포 이식은 받지 않았다. MPS I 환자는 6 내지 26개월령이었다. 건강한 대조군은 36 내지 48개월령이었다.

[0649] 통계학적 분석: MetaboAnalyst 3.0을 이용하여 무작위 포레스트 분석 및 열지도 생성을 수행하였다[R. G. Kalb, Development 120, 3063-3071 (1994); J. Zhong, et al, Journal of neurochemistry 64, 531-539 (1995) D. Van Vactor, D. P. W et al, Current opinion in neurobiology 16, 40-51 (2006); 온라인 공개 EpubFeb (10.1016/j.conb.2006.01.011). 원 피크 데이터를 로그 전환시키고, 정상 샘플값의 평균에 대해 정규화하였다. 그래프패드 프리즘 6를 이용하여 모든 다른 통계학적 분석을 수행하였다. 배양한 뉴런 아머 길이, 신경돌기 수 및 분지를 ANOVA 다음에 던넛 검정과 비교하였다. CSF 스퍼민 및 피질 GAP43을 크루스칼-왈리스 검정 다음에 튜검정에 의해 비교하였다.

[0650] GAP43 웨스턴: 전두 피질 샘플을 30 Hz에서 5분 동안 쿼아젠 티슈 라이저(Qiagen Tissuelyser)를 이용하여 0.2% 트리톤 X-100에서 균질화시켰다. 4℃에서 원심분리에 의해 샘플을 정화시켰다. BCA 분석에 의해 상청액 중의 단백질 농도를 결정하였다. 샘플을 NuPAGE LDS 완충제 중에서 DTT(써모 피셔 사이언티픽)과 함께 70℃에서 1시간 동안 인큐베이션시키고 나서, MOPS 완충제 중의 비스-트리스 4 내지 12% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리시켰다. 단백질을 PVDF 막에 전달하고 나서, 5% 탈지분유에서 1시간 동안 차단시켰다. 5% 탈지분유 중에서 1 µg/mL로 희석시킨 토끼 다클론항-GAP43 항체(Abcam) 다음에 5% 탈지분유 중에서 1:10,000으로 희석시킨 HRP 접합 다클론항-토끼 항체(써모 피셔 사이언티픽)를 이용하여 막을 프로빙하였다. 슈퍼시그널 웨스트 피코(SuperSignal West Pico) 기질(써모 피셔 사이언티픽)을 이용하여 밴드를 검출하였다. 영상 랩 5.1(Image Lab 5.1)(바이오-래드)를 이용하여 농도계측을 수행하였다.

[0651] 신경돌기 성장 분석: 기 기재한 바와 같이 제18일 배아 피질 뉴런을 채취하고, B27(길코)로 보충한 무혈청 뉴로 베이스(Neurobasal) 배지(길코(Gibco)) 내 챔버 슬라이드(시그마 S6815) 또는 폴리-L-라이신(시그마) 코팅 조직 배양 플레이트 상에서 100,000개의 세포/mL의 농도로 플레이팅하였다. 플레이팅 후 24시간에(제1일) 2회 중복해서 웰에 처리를 적용하였다. 고 콘트라스트 상에서 600 ms 수동 노출 및 1.70x 게인(gain)을 이용하여 20X로 니콘 이클립스 티(Nikon Eclipse Ti) 상에서 정량화를 위한 상-콘트라스트 영상을 촬영하였다. 개체는 웰마다 10 내지 20개의 영상을 캡처한 처리 조건에 대해 맹검이었고, 그들에 코드를 부여하였다. 영상을 ImageJ(NIH)에서 8-비트 형식으로 전환하였고, 맹검 검토자에 의해 NeuronJ에서 추적하였다. 체세포 직경, 신경돌기 수, 분지점 및 아머 길이를 수동으로 추적하였다. NeuronJ에서 추적한 영상을 영상 크기에 기반한 전환 인자를 이용하여 마이크로미터로 전환하고 나서; 2560x1920 픽셀 영상을 0.17 마이크로미터/픽셀의 전환 인자를 이용하여 마이크로미터로 전환하였다.

[0652] 조직학: 뇌 조직 가공 및 LIMP2 면역형광을 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다[C. Hinderer, et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy 22, 2018-2027 (2014); 온라인 공개 EpubDec (10.1038/mt.2014.135)].

[0653] RT-PCR: 3마리의 정상 개 및 5마리의 MPS 개로부터의 전두 피질 샘플을 피사 시 드라이 아이스 상에서 즉시 냉동시켰다. TRIzol 시약(써모 피셔 사이언티픽)을 이용하여 RNA를 추출하고 나서, 20분 동안 실온에서 DNase I (로슈(Roche))로 처리하고, 제조업자의 설명서에 따라 RNeasy 키트(쿼아젠)를 이용하여 정제하였다. 정제된 RNA(500ng)를 무작위 육량제 프라이머와 함께 고품질 cDNA 합성 키트(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 이용하여 역전사시켰다. 아르기나제, 오르니틴 데카복실라제, 스퍼민 신타제, 스퍼미딘 신타제, 스퍼민-스퍼미딘 아세틸트랜스퍼라제 및 글리세르알데하이드 인산염 탈수소효소에 대한 전사체를 어플라이드 바이오시스템즈 7500을 이용하여 사이브르 그린(Sybr green) PCR에 의해 정량화하였다.

[0654] 실시간 PCR 시스템. 모든 개개 샘플을 포함하는 풀링된 표준의 4배 희석물을 이용하여 각각의 표적 유전자에 대해 표준 곡선을 생성하였다. 가장 높은 표준에 임의의 전사체 번호를 부여하고, 개개 샘플에 대한 Ct 값을 표준 곡선에 기반하여 전사체 번호로 전환시켰다. 값을 GAPDH 대조군에 대해 표현하였다.

- [0655] 통계학적 분석: MetaboAnalyst 3.0을 이용하여 무작위 포레스트 분석 및 열지도 생성을 수행하였다[J. Xia, et al, MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. Nucleic Acids Research, (2012); 온라인 공개 EpubMay 2, 2012 (10.1093/nar/gks374); J. Xia, et al., MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. Nucleic Acids Research 37, W652-W660 (2009); 온라인 공개 EpubJuly 1, 2009 (10.1093/nar/gkp356). J. Xia, et al, MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. Nucleic Acids Research, (2015); 온라인 공개 EpubApril 20, 2015 (10.1093/nar/gkv380)]. 대사 물질 선별에서 검출 불가능한 값을 데이터 세트에서 관찰되는 최소 값에 귀속시켰다. 원 피크 데이터를 정상 샘플값의 평균에 대해 정규화시키고, 로그 변환시켰다. 그래프패드 프리즘 6를 이용하여 모든 다른 통계학적 분석을 수행하였다. 배양한 뉴런 아머 길이, 신경돌기 수 및 분지를 ANOVA 다음에 던넛 검정과 비교하였다. CSF 스퍼민 및 피질 GAP43을 크리스칼-왈리스 검정 다음에 튜 검정에 의해 비교하였다.
- [0656] 결과
- [0657] 1. 대사물질 프로파일링을 통한 상승된 CSF 스퍼민의 동정
- [0658] MPS I의 개 모델을 이용하여 CSF 대사물질의 초기 선별을 수행하였다. 이들 동물은 *IDUA* 유전자 내 스플라이스 부위 돌연변이를 운반하여, 효소 발현의 완전한 상실 및 MPS I 환자와 유사한 임상적 및 조직학적 특징의 발생을 초래하였다(K. P. Menon, et al, Genomics 14, 763-768 (1992); R. Shull, et al., The American journal of pathology 114, 487 (1984). 15마리의 정상 개 및 15마리의 MPS I 개로부터 CSF 샘플을 수집하였다. LC 및 GC-MS에 의해 대사물질의 상대적 양에 대해 CSF 샘플을 평가하였다. 질량 분석법에 의해 총 281개의 대사물질을 CSF 샘플에서 양으로 동정할 수 있다. 이들 중에서, 47마리(17%)는 대조군에 비해 MPS I 개에서 상당히 상승되었고, 88(31%)는 대조군에 비해 감소되었다. 그룹 간에 가장 상이한 50종의 대사물질의 열 지도를 도 17a에 나타낸다. 대사물질 프로파일링은 MPS I와 정상 개 사이의 폴리아민, 스펅고지질, 아세틸화된 아미노산 및 뉴클레오타이드 대사의 현저한 차이를 확인하였다. 무작위 포레스트 클러스터링 분석은 MPS I와 정상 개 사이의 대사물질 차이에 대한 가장 큰 기여자로서 폴리아민 스퍼민을 동정하였다(도 21). 평균적으로, 스퍼민은 샘플 수집 시 1개월령 미만인 한 마리의 MPS I 개를 제외하고 MPS I 개에서 30배 초과로 상승되었다. CSF에서 스퍼민을 정량적으로 측정하기 위해 안정한 동위원소 희석(SID)-LC-MS/MS 분석을 진행하였다. 혈류 증후군을 갖는 6명의 어린이(6 내지 26개월령)뿐만 아니라 2명의 건강한 대조군(36 내지 48개월령)으로부터 샘플을 선별하였다. 건강한 대조군은 둘 다 분석의 정량화 한계(1ng/mL) 미만의 CSF 스퍼민 수준을 갖는 반면, MPS I 환자로부터의 CSF 샘플은 정량화 한계를 평균 10-배로 초과하였다(도 17b). MPS IH 환자의 스퍼민 상승은 스퍼민 결합 및 흡수에서 HS의 알려진 역할과 일치되는 것으로 나타났다(M. Belting, et al, Journal of Biological Chemistry 278, 47181-47189 (2003); M. Belting, et al, Proteoglycan involvement in polyamine uptake. Biochemical Journal 338, 317-323 (1999); J. E. Welch, et al, International journal of oncology 32, 749-756 (2008)]. 상승된 CSF 스퍼민의 원인으로서 증가된 합성이 나타날 가능성은 없는데, 정상 및 MPS I 개 뇌 샘플은 폴리아민 합성 경로에서 전사적으로 조절된 효소에 대해 유사한 mRNA 발현 수준을 갖기 때문이다.
- [0659] 2. MPS와 관련된 비정상적 신경돌기 성장에서 스퍼민의 역할
- [0660] 다음의 액손 손상 뉴런은 신경돌기 증식을 촉진시키는 폴리아민 합성을 상향조절한다(D. Cai, et al, Neuron 35, 711-719 (2002); 온라인 공개 EpubAug 15; K. Deng, et al, The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 29, 9545-9552 (2009); 온라인 공개 EpubJul 29; Y. Gao, et al, Neuron 44, 609-621 (2004); 온라인 공개 EpubNov 18; R. C. Schreiber, et al., Neuroscience 128, 741-749 (2004)). 따라서 본 발명자들은 MPS 뉴런에 기재된 비정상적 신경돌기 과성장 표현형에서 스퍼민의 역할을 평가하였다(Hocquemiller, S., et al, Journal of neuroscience research 88, 202-213 (2010)). MPS I 마우스로부터의 E18 피질 뉴런의 배양물은 더 큰 신경돌기 수, 분지, 콜로니로부터의 야생형 마우스로부터 유래된 뉴런보다 배양물 중에서 4일 후의 총 아머 길이를 나타내었다(도 19a 내지 도 19f). 스퍼민 합성의 저해제인 APCHA에 의한 MPS 뉴런의 처리는 신경돌기 성장 및 분지를 상당히 감소시켰다. 효과는 스퍼민을 대체함으로써 반전 가능하였다(도 18a 내지 도 18f). 동일한 APCHA 농도는 정상 뉴런의 성장에 영향을 미치지 않았다. 생체내에서 동정한 것과 유사한 농도에서 야생형 뉴런 배양물에 대한 스퍼민의 첨가는 신경돌기 성장 및 분지의 상당한 증가를 초래하였다(도 18a 내지 도 18f).
- [0661] 3. CSF 스퍼민 및 GAP43 발현에 대한 유전자 요법의 영향
- [0662] 생체내 GAP43 발현 및 스퍼민 축적에 대한 IDUA 결핍의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 비처리 MPS I 개뿐만 아니라 CNS 관련 유전자 요법으로 치료한 개에서의 CSF 스퍼민 및 뇌 GAP43 수준을 측정하였다. 본 발명자

들은 개 IDUA 이식유전자를 운반하는 아데노 연관 바이러스형 9 벡터의 척추강내 주사로 처리한 5마리 MPS I 개를 이전에 기재하였다(C. Hinderer, et al, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 23, 1298-1307 (2015); 온라인 공개 Epub Aug). MPS I 개는 정상 IDUA 효소에 대한 항체가 발생될 수 있고, 따라서 개 중 2마리는 단백질에 대한 면역 반응을 유도하기 위해 간 IDUA 유전자 전달로 신생아로서 전처리하였다. 반응 유도된 개는 둘 다 AAV9 치료 후 정상 초파로 뇌 IDUA 활성을 잘 나타내었다. 3마리의 비-반응 유도 개는 상이한 수준의 발현을 나타내었고, 한 마리의 동물은 정상 초과 수준에 도달하며, 다른 2마리 동물은 정상 근처에서 발현을 나타내었다(도 19a 내지 도 19d). CSF 스퍼민 감소는 뇌 IDUA 활성에 반비례하며, 가장 낮은 IDUA 발현을 갖는 2마리 개에서 비처리 동물에 비해 3배 감소, 및 가장 높은 발현을 갖는 동물에서 20배 초과 감소가 있었다(도 19a 내지 도 19d). GAP43은 MPS I 개의 전두 피질에서 상향조절되었고, 모든 벡터 치료 동물에서 발현은 정상화되었다(도 19a 내지 도 19d).

[0663] 본 발명자들은 다양한 벡터 용량으로 치료한 MPS I 개에서 CSF 스퍼민 수준과 IDUA 재구성 사이의 관계를 추가로 평가하였다. 신생아 간 유전자 전달에 의해 인간 IDUA에 대해 이전에 반응 유도된 MPS I 개를 3회 용량 중 하나(1010, 1011, 1012개의 GC/kg, 용량 당 n = 2)에서 인간 IDUA를 발현시키는 AAV9 벡터의 척추강내 주사로 치료하였다(C. Hinderer, et al, *Neonatal tolerance induction enables accurate evaluation of gene therapy for MPS I in a canine model. Molecular Genetics and Metabolism*, dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.006)). 주사 6개월 후에 CSF 스퍼민을 평가하였다(도 20a 내지 도 20b). CSF 스퍼민의 감소는 용량 의존적이며, 중간 내지 높은 벡터 용량이 정상 범위에 도달하는 반면, CSF 스퍼민은 저용량 동물에서 단지 부분적으로 감소되었다. IDUA 결핍증과 CSF 스퍼민 축적 사이의 관계의 독립적 확인을 위해, 본 발명자들은 MPS I의 고양이 모델에서 CSF 스퍼민 수준을 평가하였다. 본 발명자들의 앞서 보고한 유전자 요법 연구로부터의 CSF 샘플을 이용하여, 본 발명자들은 비처리 MPS I 고양이가 상승된 CSF 스퍼민을 나타내었다는 것을 발견하였다(도 20a 내지 도 20b)(C. Hinderer, et al, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 22, 2018-2027 (2014); 온라인 공개 EpubDec (10.1038/mt.2014.135)). 고양이 IDUA를 발현시키는 고용량의 AAV9 벡터의 척추강내 투여는 CSF 스퍼민 수준을 정상화시켰다(도 20a).

[0664] C. 논의

[0665] 본 연구에서, 본 발명자들은 MPS I 개로부터의 CSF 샘플의 대사물질 프로파일링을 수행하였고, 이는 CSF 대사체에서 실질 질환 관련 변화를 나타내었다. 가장 현저한 차이는 정상 대조군에 비해 스퍼민 수준에서 30배 이상의 상승이 있었다. 이 발견은 MPS I 환자 샘플뿐만 아니라 MPS I의 고양이 모델에서 확인하였다. 스퍼민은 고친화도로 HS에 직접 결합하고, 스퍼민의 세포 흡수는 이 상호작용에 의존적이다(M. Belting, S. PERSSON, L.-A. Fransson, *Proteoglycan involvement in polyamine uptake. Biochemical Journal* 338, 317-323 (1999); J. E. Welch, et al, *International journal of oncology* 32, 749-756 (2008)). 세포 표면 프로테오글리칸, 예컨대 글리피칸-1은 그들의 HS 모이어터를 통해 스퍼민에 결합할 수 있고, 글리피칸 단백질의 내포작용 후에, HS 채의 세포내 절단은 결합된 스퍼민을 세포 내로 방출한다(Belting et al, 상기 인용; K. Ding, et al, *The Journal of biological chemistry* 276, 46779-46791 (2001); 온라인 공개 EpubDec 14). 따라서, 무손상 HS 재순환은 스퍼민 흡수에 필수적이다. IDUA 결핍증에 기인하는 비효율적인 HS 재순환은 이 스퍼민 흡수 메커니즘을 저해하여, 세포의 스퍼민 축적을 야기할 수 있었다. 대안적으로, 세포의 GAG는 스퍼민을 격리시켜, 평형상태를 세포외 분포에 바람직하게 이동시킬 수 있다. 본 연구에서 LC-MS 샘플 제조를 위해 사용한 메탄올 단백질 제거 단계는 또한 가용성 HS를 침전시키는데, 이는 CSF에서 검출된 스퍼민이 비결합이라는 것과, 따라서 GAG 결합보다는 흡수 저해가 세포의 스퍼민 축적을 초래한다는 것을 시사한다(N. Volpi, *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* 685, 27-34 (1996); published online EpubOct 11). 기능성 신경망의 형성 및 유지는 신경돌기 성장 및 시냅스 형성의 정확한 제어를 필요로 한다. 발생 동안, CNS 환경은 성인 뇌에서 신경돌기 성장을 크게 차단하는 미엘린 관련 단백질에 의한 신경돌기 형성에 대해 점점 더 저해성이 된다. 감소된 신경돌기 성장에 대한 이런 발생적 이동은 GAP43 발현의 감소와 병행된다(S. M. De la Monte, et al, *Developmental Brain Research* 46, 161-168 (1989); 온라인 공개 Epub4/1/). MPS 뉴런에 의해 나타나는 지속적 GAP43 발현 및 과장된 신경돌기 증식은 저해 및 성장 촉진 신호의 정상적 균형을 방해하여, 비정상적 연결 및 손상된 인지를 초래할 수 있다(Hocquemiller et al, 상기 인용). HS 저장에 신경돌기 성장에서 이런 증가를 야기하는 방법은 확립되지 않았다. 다수의 연구는 신경돌기 증식에서 폴리아민이 연루되었고; 액손 손상 후에, 스퍼민 및 그의 전구체 푸트레신 및 스퍼미딘의 합성을 위한 속도 제한 효소는 상승되어, 미엘린의 저해 신호의 존재에서 조차 향상된 신경돌기 증식을 허용하였다(Cia (2002), Deng (2009), Gao (2004), 모두 상기 인용). 추가로, 푸트레신에 의한 뉴런의 처리는 CSF에 직접 주사할 때 신경돌기 성장, 즉, 스퍼민 합성의 저해제에 의해 차단되는 효과를 유도한다(Deng (2009) 상기 인용). 신경돌기 성장에 대해 폴리아민이 그들의 효과를 발휘하는 메커니즘은

알려져 있지 않다. 한 가지 잠재적 표적은 NMDA 수용체이며, 이의 활성화는 스퍼민 결합에 의해 가능하게 된다 (J. Lerma, Neuron 8, 343-352 (1992); 온라인 공개 Epub2// (dx.doi.org/10.1016/0896-6273(92)90300-3)). NMDA 신호전달은 신경돌기 증식을 유도하며, 수용체의 스퍼민 민감 서브유닛은 발생 동안 고도로 발현된다(D. Georgiev, et al, Experimental cell research 314, 2603-2617 (2008); 온라인 공개 EpubAug 15 (10.1016/j.yexcr.2008.06.009); R. G. Kalb, Regulation of motor neuron dendrite growth by NMDA 수용체 activation. Development 120, 3063-3071 (1994); J. Zhong, et al, Journal of neurochemistry 64, 531-539 (1995). 특히 다수의 신경영양 인자는 HS 변형 수용체를 통해 결합하며, 세포외 기질 내 HS와의 상호작용은 신경돌기 성장에 영향을 미칠 수 있다(D. Van Vactor, et al, Current opinion in neurobiology 16, 40-51 (2006); 온라인 공개 EpubFeb (10.1016/j.conb.2006.01.011)). 따라서 스퍼민 축적은 MPS I에서 비정상적 신경돌기 성장을 촉진시키는 몇몇 인자 중 하나일 수 있다. 선별된 15마리의 MPS I 개 CSF 샘플 중에서, 한 마리만이 스퍼민 농도의 정상 범위 내로 떨어진다. 28일령에, 이는 본 연구에 포함된 가장 어린 동물이었다. 이 발견은, 본 연구가 이미 혈허 증후군이 있는 영아에서 6개월령까지 스퍼민 축적이 상승된다는 것을 입증함에도 불구하고, 스퍼민 축적이 연령 의존적일 수 있다는 것을 나타낸다. 추가 연구는 MPS 환자에서 CSF 스퍼민 수준을 장기적으로 평가하여야 한다. 스퍼민이 MPS 환자에서 연령에 따라 증가된다면, 이는 인지 감소의 역학을 설명할 수 있는데, 대부분의 환자가 발달 지연 개시 전에 1 내지 2년의 정상 발달을 경험하기 때문이다. 뉴런 성장을 변경시키는 대사물질의 축적을 촉발하는 손상된 HS 대사에 대한 가능성은 MPS에서 효소 결핍과 정상 신경돌기 성장 간의 신규한 관계를 지적할 수 있는데, 이는 이들 장애와 관련된 인지 장애를 설명할 수 있다. 추가 연구는 다른 MPS에서 스퍼민 상승을 확인하여야 한다. 이들 발견은 또한 CSF 스퍼민이 MPS에 대한 신규한 CNS-관련 요법의 약력학을 평가하기 위한 비침습적 바이오마커로서 유용할 수 있다는 것을 나타낸다. CNS 관련 요법에 대한 추가적인 시험은 CSF 스퍼민에서 인지 종말점과 변화 사이의 상관관계를 평가하여야 한다.

[0666] 실시예 12: CT 가이드된 ICV 전달 장치

[0667] A. 절차전 선별 평가

[0668] 1. 프로토콜 방문 1: 선별

[0669] 원칙적 연구자는 낭내(IC) 절차, 투여 절차 그 자체, 및 사전 동의서에 서명 시 완전히 알게 될 대상체(또는 지정된 간병인)에 대한 모든 잠재적 안전성 위험을 야기하는 선별 과정을 설명할 수 있다.

[0670] 다음을 수행하고, IC 절차를 위한 대상체 적격의 선별 평가에서 신경방사선학자/신경외과의사/마취과 의사에게 제공한다: 의학적 이력, 동시 의약, 신체 검사, 활력 징후, 심전도(ECG) 및 실험실 검사 결과.

[0671] 2. 간격: 연구 방문 2에 대한 선별

[0672] 적격성을 검토하기 위한 적절한 시간을 허용하기 위해, 다음의 절차는 제1 선별 방문과 연구 방문 2(제0일) 전 1주까지 사이의 임의의 시간에 수행하여야 한다:

[0673] • 가돌리늄을 이용하는 그리고 가돌리늄이 없는 두/경부 자기 공명 영상화(MRI) [주의: 대상체는 가돌리늄을 받는 적합한 후보여야 함(즉, eGFR >30mL/분/1.73m²)]

[0674] • 두/경부 MRI에 추가로, 연구자는 힘/연장 연구를 통해 경부의 임의의 추가적인 평가에 대한 필요를 결정할 것이다.

[0675] • MRI 프로토콜은 T1, T2, DTI, FLAIR 및 CINE 프로토콜 영상을 포함할 것이다.

[0676] • CSF 유동의 적절한 평가 및 CSF 공간 사이의 통신의 가능한 차단 또는 결여의 확인을 허용하는 협회 프로토콜에 따른 두/경부 MRA/MRV(주의: 경막내/경경막 수술 이력이 있는 대상체는 제외될 수 있거나 또는 추가적인 검사(예를 들어, 방사성뉴클레오타이드 뇌조영술)가 필요할 수 있음).

[0677] • 신경방사선학자/신경외과의사 대상체 절차 평가 미팅: 3개 장소로부터의 대표는 모든 이용 가능한 정보(스캔, 의학적 이력, 신체 검사, 실험실 등)에 기반한 IC 절차에 대해 각각의 대상체의 적격성을 논의하기 위해 전화회의(또는 웹 미팅)를 가질 것이다. IC 절차에 대한 진행 또는 대상체 선별 실패에 대한 합의를 달성하기 위한 모든 시도를 하여야 한다(즉, 각각의 구성원은 이루어진 결정을 허용하도록 준비하여야 한다).

[0678] • MPS 대상체의 전문적인 생리적 필요를 유념해 두고 기도, 경부(단축/비후화) 및 두부 운동 범위(경부 구부러짐 정도)의 상세한 평가에 의한 -제28일 내지 제1일의 마취 수술 전 평가.

[0679] 3. 제1일: 투여를 위한 컴퓨터 단층촬영 세트 및 벡터 제조. IC 절차 전에, CT 스윙트는 다음의 장비를 확인하

고, 의약이 제공될 것이다:

- [0680] · 성인 요추 천자(LP) 키트(기관마다 공급됨);
- [0681] · BD(백톤 딕킨슨(Becton Dickinson)) 22 또는 25 게이지 x 3 - 7"스파이날 니들(퀸케 베벨(Quincke bevel));
- [0682] · (스파이날 니들의 도입을 위해)중재자의 판단 시 사용되는 공축 삽입기 바늘(예를 들어, 18G x 3.5"
- [0683] · 스위블(스핀) 수 루어락을 갖는 4원 스몰 보어(small bore) 스탭콕;
- [0684] · 대략의 길이가 6.7"인 암 루어락 어댑터를 갖는 T-커넥터 연장 세트(관);
- [0685] · 척추강내 투여를 위한 옴니파큐(Omnipaque) 180(이오핵솔);
- [0686] · 정맥내(IV) 투여를 위한 요오드화된 조영제;
- [0687] · 1% 리도카인 주사용 용액(성인 LP 키트에서 공급되지 않는다면);
- [0688] · 사전 충전된 10cc 생리 식염수(멸균) 플러시 주사기;
- [0689] · 방사선 불투과성 마커(들);
- [0690] · 수술 준비 장비/면도기
- [0691] · 베개/삽관한 대상체의 적절한 자세를 허용하는 지지체;
- [0692] · 기관내 삽관 장비, 일반적 마취 기계 및 기계적 벤틸레이터;
- [0693] · 수술 중 신경계 추적감시(IONM) 장비(및 필요한 인원)
- [0694] · AAV9.hIDUA 백터를 함유하는 10cc 주사기; 별개의 조제 매뉴얼에 따라 CT/수술실(OR) 시설에 준비되고 수송 됨.
- [0695] 4. 제1일: 대상 제제 및 투약
- [0696] · 연구 및 절차에 대한 사전동의를 확인하고 의학적 기록 및/또는 연구 파일에 기록할 것이다. 시설의 필요에 따라 방사선학 및 마취과 스태프로부터의 절차에 대한 별개의 동의를 얻을 것이다.
- [0697] · 연구 대상체는 시설 가이드라인에 따른 적절한 병원 치료 병동(예를 들어, 2개의 IV 접근 장소) 내에서 정맥 내 접근에 놓일 것이다. 정맥내 유체는 마취과 의사의 재량으로 투여할 것이다.
- [0698] · 마취과 의사의 재량으로 그리고 시설 가이드라인에 따라, 연구 대상체는 적절한 환자 치료 병동, 대기구역 또는 수술적/CT 절차 시설 내 일반적 마취제의 투여와 함께 기관내 삽관이 유도되고 겪을 것이다.
- [0699] · 요추 천자를 수행하여 처음에 5 cc의 뇌척수액(CSF)을 제거하고 그리고 후속적으로 대조의 시각화를 돕도록 조영제(옴니파크 180)를 척추강내로 주사할 것이다. 적절한 대상체 자세 조작을 수행하여 대조 내로 조영제의 확산을 용이하게 할 것이다.
- [0700] · 아직 행하고 있지 않다면, 수술 중 신경계 추적감시(IONM) 장비를 대상체에게 부착할 것이다.
- [0701] · 대상체는 복와 또는측와위 자세로 CT 스캐너 테이블 상에 위치시킬 것이다.
- [0702] · 적절한 것으로 여겨진다면, 대상체는 수술전 평가 동안 안전한 것으로 결정된 정도로 경부 구부림을 제공하는 방식으로 그리고 자세잡기 후에 기록된 정상 신경 생리학적 모니터 신호에 의해 자세를 잡을 수 있을 것이다.
- [0703] · 다음의 연구 스태프 및 연구자(들)를 제공되고 현장에서 확인할 것이다:
- [0704] ° 절차를 수행하는 중재자/신경외과의사
- [0705] ° 마취과 의사 및 호흡 기술자(들)
- [0706] ° 간호사 및 의사 보조자
- [0707] ° CT(또는 OR) 기술자
- [0708] ° 신경생리학 기술자

- [0709] ◦ 현장 연구 조정자
- [0710] · 두개저 하의 대상체의 피부는 적절하게 면도할 것이다.
- [0711] · CT 스카우트 영상을 수행한 후에, 표적 위치를 국소화하고 혈관을 영상화하는 것이 중재자에 의해 필요한 것으로 여겨진다면, IV 조영제를 이용하여 사전 절차 계획 CT를 수행할 것이다.
- [0712] · 일단 표적 부위(대조)를 동정하고 바늘 궤적을 계획하고, 기관의 가이드라인에 따라 피부를 준비하고 멸균 기법을 이용하여 감쌀 것이다.
- [0713] · 방사선 불투과성 마커를 중재자에 의해 표시되는 표적 피부 위치 상에 둘 것이다.
- [0714] · 마커 하의 피부를 1% 리도카인을 이용하는 침윤을 통해 마취시킬 것이다.
- [0715] · 22G 또는 25G 스파이날 니들은 공축 삽입기 바늘의 사용을 위한 선택사항과 함께 대조를 향해 전진시킬 것이다.
- [0716] · 바늘 전진 후에, 협회 장비를 이용하여 실현 가능한 가장 얇은 CT 슬라이스 두께(이상적으로는 2.5mm 이하)를 이용하여 CT 영상이 얻어질 것이다. 일련의 CT 영상은 바늘 및 적절한 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 뼈, 뇌 줄기 및 척수)의 적절한 시각화를 허용하는 가장 낮은 방사선량을 이용하여야 한다.
- [0717] · 바늘 허브 내 CSF의 관찰 및 대조 내의 바늘팁의 시각화에 의해 정확한 바늘 위치를 확인할 것이다.
- [0718] · 중재자는 백터를 함유하는 주사기가 멸균장에 가깝지만, 밖에 위치된다는 것을 확인할 것이다. 조작 또는 백터 투여 전에, 현장에서 절차를 보조하는 스태프에 의해 장갑, 마스크 및 보안경이 멸균장 내에서 착용되는지를 확인할 것이다(멸균장 밖의 다른 스태프는 이들 절차를 취할 필요가 없다).
- [0719] · 짧은(~6"연장관을 삽입 스파이날 니들에 부착할 것이며, 이를 다음에 4-원 스탬프에 부착할 것이다. 일단 이 장치가 대상체의 CSF에 의해 "자기-프라이밍"된다면, 10cc 사전충전 생리 식염수 플러시 주사기는 4원 스탬프에 부착될 것이다.
- [0720] · 백터를 함유하는 주사기를 중재자에게 건네고, 4-원 스탬프 상의 포트에 부착할 것이다.
- [0721] · 백터를 함유하는 주사기에 대한 스탬프 포트가 개방되면, 주사기 내용물은(대략 1 내지 2분에 걸쳐) 서서히 주사되고, 주사 동안 플러시 상에 과도한 힘을 적용하지 않도록 주의한다.
- [0722] · 일단 AAV9.hIDUA 시험 백터를 함유하는 주사기의 내용물이 주사되면, 부착된 사전 충전 주사기를 이용하여 1 내지 2cc의 생리 식염수에 의해 스탬프 및 바늘 조립체가 플러싱될 수 있도록 스탬프는 전환될 것이다.
- [0723] · 준비가 될 때, 그 다음에 중재자는 그/그녀가 대상체로부터 장치를 제거할 것임을 스태프에게 알릴 것이다.
- [0724] · 1회의 움직임에서, 바늘, 연장관, 스탬프 및 주사기는 대상체로부터 서서히 제거하고, 생물학적으로 위험한 폐기물 리셉터클 또는 딱딱한 컨테이너(바늘(들)용)에 버리기 위한 수술 트레이 상에 놓을 것이다.
- [0725] · 바늘 삽입 부위를 출혈 또는 CSF 누출의 징후에 대해 시험하고, 연구자에 의해 표시되는 바와 같이 치료할 것이다. 표시하는 바와 같이 거즈, 수술용 테이프 및/또는 테가덤(Tegaderm) 드레싱을 이용하여 부위를 드레싱할 것이다.
- [0726] · 이어서, 대상체를 CT 스캐너로부터 제거하고 나서, 들것에 양와위로 위치시킬 것이다.
- [0727] · 마취는 중단하고, 대상체는 마취후 치료를 위한 협회의 가이드라인에 따라 치료할 것이다. 연구 대상체로부터 신경생리학 모니터를 제거할 수 있다.
- [0728] · 대상체가 누워있는 들것의 머리부를 회복 동안 약간 높여야 한다(대략 30도).
- [0729] · 대상체를 협회 가이드라인에 따라 적합한 마취후 치료실로 이동시킬 것이다.
- [0730] 대상체는 적절하게 의식이 회복되고 안정한 상태가 된 후에, 그/그녀는 프로토콜 규정 평가를 위해 적절한 바닥/병실로 들어갈 것이다. 신경학적 평가는 프로토콜에 따를 것이며, 1차 연구자는 병원 및 연구 스태프와의 협진으로 대상체 치료를 감독할 것이다.
- [0731] 실시예 13: 거대 동물에서 척추강내 투여 경로의 평가
- [0732] 본 연구의 목적은 뇌실내(ICV) 주사 및 요추 천자를 통한 주사를 포함하는 CSF 내로의 더 일상적인 투여 방법을

평가하는 것이다. 간략하게, 본 연구에서 ICV 및 IC AAV 투여를 개에서 비교하였다. 주사 후 트랜스넨버그 위치로 놓인 일부 동물이 있는 비인간 영장류에서의 요추 천자를 통해 백터 투여를 평가하였으며, 이 조치는 백터의 두개골 분포를 개선시키는 것을 시사하였다. 개 연구에서, ICV 및 IC 백터 투여는 뇌 및 척수 전체적으로 유사하게 효율적인 형질도입을 초래하였다. 그러나, ICV 코호트 내 동물은 이식유전자 산물에 대한 중증의 T 세포 반응 때문에 분명하게 뇌염이 발생되었다. ICV 코호트 단독에서 이 이식유전자-특이적 면역 반응의 발생은 이식유전자 발현 부위에서 주사 절차로부터의 국소화된 염증의 존재와 관련되는 것으로 의심된다. NHP 연구에서, 극도로 큰 주사 용적(대략 40%의 총 CSF 용적)을 이용함으로써 요추 뇌조 내로 백터 투여 후 형질도입 효율은 본 발명자들의 이전의 연구에 비해 개선되었다. 그러나, 이 접근은 IC 투여보다 훨씬 덜 효율적이었다. 주사 후 트랜스넨버그로 동물의 자세잡기는 추가적인 이점을 제공하지 않는다. 그러나, 큰 주사 용적이 백터의 두개 분포를 개선시킬 수 있었다는 것을 발견하였다.

[0733] 척추강내 AAV 전달의 유효성을 최대화하기 위해, CSF 내로 백터 투여의 최적의 경로를 결정하는 것은 중요한 것이다. 본 발명자들은 후두골 천자에 의한 대조(소뇌연수 수조) 내로 백터 주사는 비인간 영장류에서 효과적인 백터 분포를 달성한 반면, 요추 천자를 통한 주사는 척수의 실질적으로 더 낮은 형질도입 및 사실상 뇌에 대한 무분포를 초래하고, 투여 경로의 중요성을 강조한다는 것을 이전에 보고하였다[Hinderer, *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*. 12/10/online 2014;1]. 다른 것은 통상적인 임상 절차인 측면 뇌실 내로의 백터 전달이 효과적인 백터 분포를 초래한다는 것을 시사하였다[Haurigot et al, *J Clin Invest.*, Aug 2013; 123(8): 3254-3271]. 또한 두개 백터 분포를 촉진시키기 위한 주사 후에 트랜스넨버그 위치에 동물을 위치시킴으로써 요추 천자를 통한 전달이 개선될 수 있다는 것을 보고하였다[Meyer et al, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. Oct 31 2014]. 본 연구에서, 본 발명자들은 개에서 녹색 형광 단백질(GFP) 리porter 유전자를 발현시키는 AAV9 백터의 뇌실내 투여와 낭내 투여를 비교하였다. 본 발명자들은 뇌실내 전달이 이식유전자-특이적 면역 반응의 추가적인 위험을 옮길 수도 있지만, CNS 전체적으로 효과적인 분포를 달성한다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 또한 NHP에서 요추 천자에 의한 백터 전달 및 트랜스넨버그 위치에 동물을 위치시키는 것의 영향을 평가하였다. 본 발명자들은 큰 주사 용적이 백터의 두개 분포를 개선시킬 수 있다는 것을 발견하였지만 주사후 자세의 분명한 효과는 없었다.

[0734] A. 물질 및 방법

[0735] 1. 백터 생성: GFP 백터는 거대세포바이러스 급조기 인헨서를 갖는 닭 베타 액틴 프로모터, 인공 인트론, 향상된 녹색 형광 단백질 cDNA, 우드치크 간염 바이러스 전사후 조절 요소, 및 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하는 발현 카세트를 운반하는 AAV 혈청형 9 캡시드로 이루어진다. GUSB 백터는 거대세포바이러스 급조기 인헨서를 갖는 닭 베타 액틴 프로모터, 인공 인트론, 개 GUSB cDNA, 및 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 서열을 포함하는 발현 카세트를 운반하는 AAV 혈청형 9 캡시드로 이루어진다. HEK 293 세포의 삼중 형질감염에 의해 백터를 생성하고 나서, 앞서 기재한 바와 같이 이오딕사놀 구매 상에서 정제하였다[Lock et al, *인간 유전자 요법*. Oct 2010; 21(10):1259-1271].

[0736] 2. 동물 실험: 모든 개를 동물 연구의 관리 및 사용을 위한 미국 국립 보건원 및 USDA 가이드라인 하에 펜실베이니아 유니버시티 수의학과의 인간 유전자 질환의 동물 모델에 대한 국립 진료 협력 센터에서 얻었다(NIH OD P40- 010939).

[0737] 3. NHP 연구: 본 연구는 9세 내지 12세의 6마리 사이노몰거스 원숭이를 포함하였다. 동물은 주사 시 4 내지 8kg 이었다. 백터(2×10^{13} GC)를 주사 전에 5mL의 음니파크(이오헥솔) 180 조영 물질 중에서 희석시켰다. 요추 천자를 통한 백터의 주사를 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다[Hinderer, *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*. 12/10/online 2014;1]. 형광 투시법에 의해 척추강내 공간 내로 정확한 주사를 확인하였다. 트랜스넨버그 그룹 내 동물에 대해, 주사 직후에 침대의 머리부분을 10분 동안 30도 낮춘다. 앞서 기재한 바와 같이 안락사 및 조직 수집을 수행하였다[Hinderer, *Molecular Therapy – Methods & Clinical Development*. 12/10/online 2014;1].

[0738] 4. 개 연구: 본 연구는 6마리의 1세 MPS I 개를 포함하였다. 주사 순서를 계획하기 위해 모든 ICV 치료 개에 대해 기준 MRI를 수행하였다. 앞서 기재한 바와 같이 낭내 주사를 수행하였다[Hinderer et al, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. Aug 2015;23(8):1298-1307]. ICV 주사를 위해, 정맥내 프로포폴을 이용하여 개를 마취시키고, 기관내로 삽관한 다음, 아이소플루란을 이용하여 마취하에 유지하고, 입체 정위 프레임에 위치시켰다. 피부를 멸균으로 준비하고 주사 부위 위로 절개하였다. 26-게이지 바늘을 사전결정된 깊이까지 정진시켰지만 주사 부위에서 단일 천두술로 드릴링하였다. CSF 복귀에 의해 위치를

확인하였다. 벡터(1mL 중의 1.8×10^{13} 개 GC)를 1 내지 2분에 걸쳐 서서히 주입하였다. 앞서 기재한 바와 같이 안락사 및 조직 수집을 수행하였다[Hinderer et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Aug 2015;23(8):1298-1307].

- [0739] 5. 조직학: GFP 발현의 평가를 위해 기재한 바와 같이 뇌를 가공하였다[Hinderer, Molecular Therapy – Methods & Clinical Development. 12/10/online 2014;1]. 앞서 기재한 바와 같이 GUSB 효소 염색 및 GM3 염색을 수행하였다[Gurda et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Oct 8 2015.]
- [0740] 6. ELISPOT: 부검 시 해파린처리 관에서 벡터 치료 개로부터의 혈액을 수집하였다. 말초 혈액 단핵 세포를 피콜 구배 원심분리에 의해 분리시켰다. AAV9 캡시드 펩타이드 및 GFP 펩타이드에 대한 T 세포 반응을 인터페론 감마 ELISPOT에 의해 평가하였다. AAV9 및 GFP 펩타이드 라이브러리를 10개의 아미노산 중복이 있는 15-량체로서 합성하였다(미모토펜스(Mimotopes)). AAV9 펩타이드 라이브러리를 3개 풀에서 그룹화하였다: 펩타이드 1 내지 50의 풀 A, 펩타이드 51 내지 100의 풀 B 및 펩타이드 101 내지 146의 풀 C. GFP 펩타이드 라이브러리를 또한 3개 풀에서 그룹화하였다. 포볼 12- 미리스테이트 13-아세테이트 + 로노마이신 염(PMA+ION)을 양성 대조군으로서 사용하였다. DMSO를 음성 대조군으로서 사용하였다. 펩타이드를 이용하여 세포를 자극하고 나서, 기재한 바와 같이 인터페론 감마 분비를 검출하였다. 백만개의 림프구 당 55개 초과 스폿 형성 단위(Spots Forming Unit: SFU) 그리고 DMSO 음성 대조군 값의 적어도 3배라면 반응을 양성으로 고려하였다.
- [0741] 7. 생체내 분포: 부검 시 생체내 분포에 대한 조직을 드라이 아이스 상에서 즉시 냉동시켰다. 기재한 바와 같이 택맨 PCR에 의해 DNA 분리 및 벡터 게놈의 정량화를 수행하였다[Wang et al, Human gene therapy. Nov 2011;22(11):1389-1401].
- [0742] 8. GUSB 효소 분석: 기재한 바와 같이 GUSB 활성을 CSF에서 측정하였다[Gurda et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Oct 8 2015].
- [0743] B. 결과
- [0744] 1. 개에서 뇌실내 및 낭내 벡터 전달의 비교
- [0745] 라이소좀 저장 질환 I형 점액다당류증(MPS I)의 개 모델을 이용하는 본 발명자들의 이전의 연구는 대조 내로 AAV9 주사가 전체 뇌 및 척수를 표과적으로 표적화할 수 있다는 것을 입증하였다[Hinderer et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Aug 2015;23(8):1298-1307]. 본 연구에서, 본 발명자들은 성인 MPS I 개의 대조 또는 측면 뇌실 내로 투여된 GFP 리포터 유전자를 발현시키는 AAV9 벡터의 분포를 비교하였다. 대조 내로 벡터의 단일 1mL 주사(1.8×10^{13} 개 게놈 복제물)로 3마리 개를 치료하였다. 3마리의 추가적인 개는 측면 뇌실 내로 동일한 벡터의 단일 벡터 주사를 받았다. ICV 주사에 의해 치료되는 개에 대해, 주사를 위한 더 큰 측면 뇌실을 선택하기 위해 그리고 표적 좌표를 정하기 위해 기준 MRI를 수행하였다. 지정된 뇌실을 정확하게 표적화하기 위해 입체정위 프레임을 이용하여 주사를 수행하였다.
- [0746] IC 벡터 주사로 치료한 3마리의 개는 연구 내내 건강한 상태로 나타났다. 벡터 생체내 분포 및 이식유전자 발현의 평가를 위해 벡터 주사 2주 후에 그들을 안락사시켰다. 임의의 IC 치료 개에서 덩어리 또는 미시적 뇌 병변은 관찰되지 않았다(도 14). 정량적 PCR에 의한 벡터 게놈의 측정은 뇌 및 척수의 모든 샘플링 영역 전체적으로 벡터 침착을 나타내었다(도 15). 벡터 게놈의 분포와 일치되게, 대뇌 피질의 대부분의 영역에서뿐만 아니라 척수 전체적으로 강한 이식유전자 발현을 검출 가능하였다. 척수 조직학은 알파 운동 뉴런의 강한 형질도입에 대해 주목할 만하며, 형질도입의 구배는 흉추 및 요추 분절에 바람직하였다.
- [0747] 벡터 주사된 ICV로 치료한 3마리 개는 초기에 절차 후에 건강한 상태로 나타났다. 그러나, 한 마리 동물(I-567)은 주사 12일 후에 죽은 것을 발견하였다. 다른 2마리 동물은, 비록 한 마리 동물(I-565)은 안락사 전에 혼수상태가 되었고 다른 한 마리(I-568)는 안면근의 쇠약을 나타내기 시작하였지만, 표시한 14일 부검 시점까지 살아있었다. 이들 임상 소견은 상당히 큰 뇌 병변과 관련되었다. 3마리 동물로부터의 뇌는 바늘 추적 주변의 변색을 나타내었으며, 죽은 것으로 발견된 동물에서의 출혈과 관련되었다. 조직학적 평가는 주사 부위 주변 영역에서 중증의 림프구 염증을 나타내었다. 각각의 동물의 뇌 전체적으로 혈관주위 림프구 침윤이 또한 관찰되었다. 면역학적 독성에 대한 이 증거를 고려하여, AAV9 캡시드 단백질과 GFP 이식유전자 둘 다에 대한 T 세포 반응을 부검 시 ICV-치료 개 중 한 마리(I-565)로부터 수집한 말초 혈액 샘플에서 평가하였다. 인터페론 감마 ELISPOT는 GFP와 관련된 강한 T 세포 반응을 나타내었고, 캡시드 펩타이드에 대한 반응의 증거는 없었다.

이는 관찰된 뇌염이 이식유전자 산물에 대한 세포-매개 면역 반응에 의해 야기되었다는 것을 시사한다.

[0748] ICV 치료 동물에서 백터 분포는, 척수 형질도입이 IC 코호트에서 다소 컸지만 IC 치료 그룹에서 관찰된 것과 유사하였다(도 15). ICV 치료 동물에서 시험한 CNS 영역 전체적으로 GFP 발현이 관찰되었다.

[0749] AAV9 발현 GFP의 ICV 투여와 관련된 독성은 이식유전자 산물에 대한 면역 반응과 일치되었다. 이러한 면역 반응은 특히 GFP 이식유전자가 완전히 외래이기 때문에 특히 심할 수 있고; 동물은 내인성 단백질과 유사한 이식유전자에 대해 더 면역적으로 관용성일 수 있다.

[0750] 2. NHP에서 요추 천자에 의한 AAV9 투여 후 CNS 형질도입에 대한 트랜스페넌버그 위치의 영향

[0751] 본 발명자들은 이전에 NHP의 대조 또는 요수 내로의 AAV9 주사를 비교하였고, 요수 경로가 척수를 표적화하는 것보다 10배 덜 효율적이고, 뇌를 표적화하는 것보다 100배 덜 효율적이라는 것을 발견하였다[C. Hinderer, et al, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. 12/10/online 2014;1]. 다른 연구자들은 동물을 주사 후에 트랜스페넌버그 위치에 위치시킴으로써 달성된 백터의 두개 분포에서의 개선과 함께 요추 천자에 의한 AAV9 투여를 이용하는 더 양호한 형질도입을 입증하였다[Myer et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Oct 31 2014]. 이 접근에서, 용액 밀도를 증가시키기 위해 과량의 용적의 조영제로 백터를 희석시키고, 트랜스페넌버그에 있는 동안 중력 유도 분포를 촉진시켰다. 6명의 성인 사이노물거스 원숭이를 L3-4 간극에서 AAV9 발현 GFP(2×10^{13} 개 게놈 복제물)의 단일 주사로 치료하였다. 이오hexol 180 조영제에서 5mL의 최종 용적으로 백터를 희석시켰다. 동물 중 4마리를 주사 직후 10분 동안 -30도에서 절차 테이블의 머리부에 위치시켰다. 10분 후에, CSF에서 조영제 분포를 확인하기 위해 형광 영상을 캡처하였다. 특히, 이 큰 주사 용적(동물의 대략 40%의 총 CSF 용적)[Reiselbach et al, New England Journal of Medicine. 1962;267(25):1273-1278] 조영제를 전체 척수 지주막하공간을 따라서 그리고 트랜스페넌버그 위치에 위치되지 않은 동물에서조차 기저 뇌조 내로 빠르게 분포시켰다(도 18). PCR(도 19) 및 GFP 발현(도 20)에 의한 백터 게놈 분포의 분석은 뇌 및 척수 전체적으로 형질도입을 입증하였다. 형질도입 세포의 수 또는 분포에 대한 주사후 위치의 분명한 영향은 없었다. 앞서 보고한 바와 같이, 척추강내 AAV 투여 후 주변부 및 간 형질도입에 대한 백터 탈출이 있었다[Hinderer et al, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. 12/10/online 2014;1; Haurigot et al, Journal of Clinical Investigation. Aug 2013; 123(8): 3254-3271]. 간 형질도입 정도는 AAV9에 대해 이미 존재하는 중화 항체(NAb)의 존재에 의존하였다. 6마리의 동물 중 4마리는 검출 가능한 기준 AAV9 NAb(역가 <1:5)가 없었고, 2마리 동물(4051 및 07-11)은 1:40의 역가로 AAV9에 대해 검출 가능한 이미 존재하는 항체가 있었다. 이전의 결과와 일치되게, 이미 존재하는 항체는 간 형질도입을 차단하였고 비장에 대해 증가된 백터 분포를 초래하였다[Wang et al, Human gene therapy. Nov 2011;22(11):1389-1401, but had no impact on CNS transduction; Haurigot et al, Journal of Clinical Investigation. Aug 2013;123(8):3254-3271].

[0752] C. 논의

[0753] 후두골 천자는 임상 실행에서 통상적인 절차가 아니기 때문에, 본 발명자들은 측면 뇌실 및 요수를 포함하는 CSF 접근의 더 일상적인 부위를 평가하였다. 본 명세서에서 본 발명자들은 요추 영역으로부터 두개골 위치에 백터 분포를 개선시키기 위해 더 고밀도를 갖는 백터 용액 및 주사후 트랜스페넌버그 위치를 사용하는 방법을 평가하였다.

[0754] 개 연구에서, IC와 ICV 백터 주사는 둘 다 유사하게 효과적인 백터 분포를 수득하였지만, 뇌염은 ICV 그룹에서만 생겼다. GFP 이식유전자에 대한 T 세포 반응은 ICV 치료 개 중 한 마리에서 검출 가능하였는데, 이들 동물에서 관찰된 림프구 뇌염은 이식유전자-특이적 면역 반응에 기인하였다는 것을 시사한다. 새로운 항원에 대한 T 세포 반응의 유도는 2가지 요소(미경험 T 세포에 의한 단백질로부터의 에피토프 인식, 및 T 세포의 활성화를 촉진시키는 염증 "위험 신호")를 필요로 한다. AAV는 선천성 면역계를 활성화시키지 않기 때문에 이식유전자 산물에 대한 면역 유도 없이 외래 이식유전자를 발현시킬 수 있는 것으로 여겨지며, 이에 의해 미경험 림프구가 새로 발현된 항원과 접할 때 염증 신호를 피하고 면역보다는 관용을 촉진시킨다. 뇌 실질을 침투하고 외래 유전자 산물이 발현되는 동일한 위치에서 생기는 외상에 의해 야기되는 국소 염증은 이식유전자 산물에 대한 면역 반응을 유도하는 데 필요한 위험한 신호를 제공할 수 있다. 이는 직접 뇌 주사에 의하지만 IC 주사에 의하지 않는 전달된 AAV 백터로부터 발현된 효소에 대해 세포-매개 면역 반응을 발생시키는, MPS I 개에서의 이전의 연구에 의해 뒷받침된다[Ciron et al, Annals of Neurology. Aug 2006;60(2):204-213; Hinderer, et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Aug 2015;23(8):1298-1307]. 이러한 면역 반응에 대한 가능성은 이식유전자 산물이 외래로서 인식되는지의 여부에 의존할 것이다 - 또한 내인성으로 생성

된 단백질을 발현시키는 벡터의 전달을 위해, 주사에 의해 야기된 염증 반응 조차 자기 단백질에 대한 관용을 파괴하지 않을 수 있다. 이는 이식유전자 산물과 유사한 단백질의 생성을 허용하는 미스센스 돌연변이를 운반하는 열성 질환을 갖는 환자에 대해 사실일 수 있다. 따라서 면역 위험은 환자 집단 및 이식유전자 산물에 따라 다를 수 있으며, 일부 경우에, 면역억제는 이식유전자에 대한 파괴적 T 세포 반응을 방지하는 데 필수적일 수 있다. 본 발현은 유해한 면역 반응의 위험이 투여의 ICV 투여보다는 IC를 이용함으로써 완화될 가능성이 있다는 것을 시사한다.

[0755] NHP 내 요추 천자를 통한 AAV9 투여 연구는 본 발명자들이 이 투여 경로에 의해 이전에 관찰한 것보다 CNS 전체적으로 더 큰 형질도입을 나타내었다. 이 차이는 본 연구에서 큰 주사 용적에 기인하여 나타나는데, 이는 과량 용적의 조영제 내로 벡터를 회식시키기 위해 필수적이었다. 이전의 연구는 이러한 큰 용적 주사(대략 40%의 CSF 용적)가 기저 뇌조 및 심지어 마카크의 심실 CSF 내로 직접적으로 주사 물질을 유도할 수 있다는 것을 나타내었다[Reiselbach, 상기 인용]. 이 접근을 복제하는 것은 환자에게 일상적으로 투여되지 않는 극도로 큰 주사 용적(>60mL)을 필요로 한다는 것을 고려하면, 이 접근을 인간에 대해 전환하기 위한 가능성은 불분명하다. 게다가, 이런 고용적 접근에 의할때 조차, 요추 천자를 통한 주사는 IC 전달에 의한 이전의 결과보다 덜 효율적이었다. 이런 이전의 연구에서, 동물에 중량으로 투약하였고, 따라서 한 마리의 동물만이 본 명세서에서 사용한 것과 동등한 IC 벡터 용량을 받았다[Hinderer, et al, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. 12/10/online 2014;1]. 상기 동물은 뇌 및 척수에서 평균 3배 더 높은 벡터 분포를 가졌는데, 이는 요수에 대해 매우 큰 용적 벡터 전달 조차 IC 전달보다 덜 효율적이라는 것을 나타낸다. 문헌에서의 보고와 대조적으로, 본 발명자들은 요추 벡터 주사 후 트랜스렌버그 위치에서 동물을 위치시키는 것에 대한 추가적인 이점을 발현하지 못하였다[Meyer et al, Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. Oct 31 2014].

[0756] 이들 발견은 함께 대조 수준에서의 벡터 투여를 뒷받침하는데, 이 접근은 요추 천자를 통한 투여보다 더 효율적인 벡터 분포를 달성하며, 그리고 ICV 투여 보다 이식유전자 산물에 대해 더 적은 위험의 면역을 운반하는 것으로 나타나기 때문이다. 대조에 대한 벡터 전달은 전임상 연구에서 사용한 후두골 천자 접근을 이용하여 임상적으로 수행할 수 있었다. 추가적으로, 측면 접근(C1-2 천자)을 이용하는 제1 경추와 제2 경추 사이의 지주막하공간 내로의 주사는 대조에 대한 주사 부위의 근접성을 제공하는 유사한 벡터 분포를 생성할 가능성이 있다. C1-2 접근은 후두골 천자와 달리, CSF 접근을 위해, 특히 척추강내 조영제 투여를 위해 임상적으로 널리 사용된다는 추가적인 이점을 가진다.

[0757] 본 출원은 2018년 1월 11일자로 출원된 미국 출원 특허 제62/616,106호, 2017년 7월 10일자로 출원된 미국 출원 특허 제62/530,614호, 2017년 7월 6일자로 출원된 미국 특허 제62/529,385호와 같이 본 명세서에 참고로 포함된 서열목록을 포함한다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개개 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 나타나는 것과 같이 그들이 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 앞서 언급한 발명은 이해의 명확함의 목적을 위해 예시로서 그리고 실시예에 의해 일부 상세하게 기재하였지만, 특정 변화 및 변형은 첨부된 청구범위의 정신 또는 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어지는 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0758] 표

(서열 목록 자유 텍스트)

다음의 정보는

수치 식별자<223> 하에 자유 텍스트를 포함하는 서열을 제공한다.

서열번호	<223> 하의 자유 텍스트
3	<223> CB7.CI.hIDUAco.RBG <220> <221> misc_특징 <222> (1)..(130) <223> 5"ITR

[0759]

	<220> <221> 프로모터 <222> (198)..(579) <223> CMV IE 프로모터 <220> <221> 프로모터 <222> (582)..(863) <223> CB 프로모터 <220> <221> TATA_신호 <222> (836)..(839) <220> <221> 인트론 <222> (956)..(1928) <223> 닭 베타-액틴 인트론 <220> <221> CDS <222> (1990)..(3948) <223> 인간 IDUA co <220> <221> 폴리 A_신호 <222> (4000)..(4126) <223> 토끼 글로빈 폴리 A
5	<223> 벡터 계놈 - TBG.PI.hIDUAco.RBG <220> <221> 반복부_영역 <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> 인핸서 <222> (221)..(320) <223> 알파 mic/Bik

[0760]

	<220> <221> 인핸서 <222> (327)..(426) <223> 알파 mic/Bik <220> <221> 프로모터 <222> (442)..(901) <223> TBG <220> <221> TATA_신호 <222> (885)..(888) <220> <221> 인트론 <222> (1027)..(1157) <220> <221> misc_특징 <222> (1251)..(3212) <223> 인간 알파-L-IDUA 암호 서열 <220> <221> 폴리 A_신호 <222> (3261)..(3387) <223> 토끼 글로빈 폴리 A <220> <221> 반복부_영역 <222> (3476)..(3605)
6	<223> 벡터 계놈: CMV.PI.hIDUAco.SV40 <220> <221> 반복부_영역 <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_특징

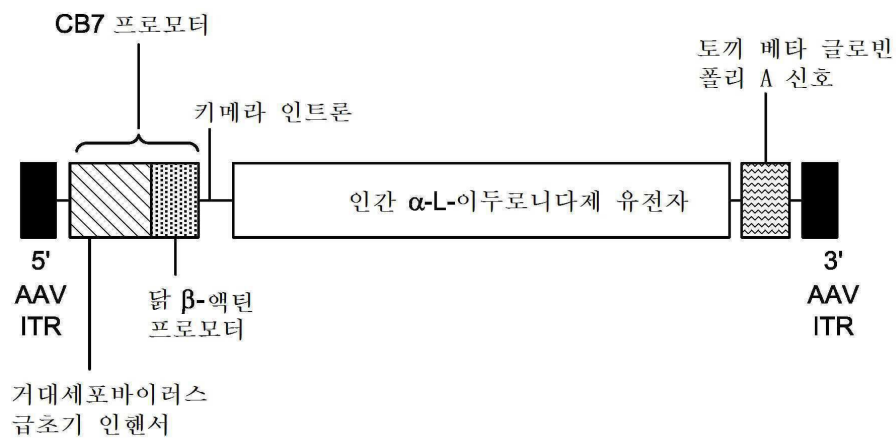
[0761]

	<222> (143)..(181) <223> CMV 인핸서 및 프로모터 <220> <221> TATA_신호 <222> (910)..(916) <220> <221> 인트론 <222> (1024)..(1221) <223> 키메라 인트론 <220> <221> misc_특징 <222> (1284)..(3246) <223> 인간 IDUA 암호 서열 <220> <221> 폴리 A_신호 <222> (3258)..(3496) <220> <221> 반복부_영역 <222> (3562)..(3691)
7	<220> <223> hu14/아데노 연관 바이러스 9

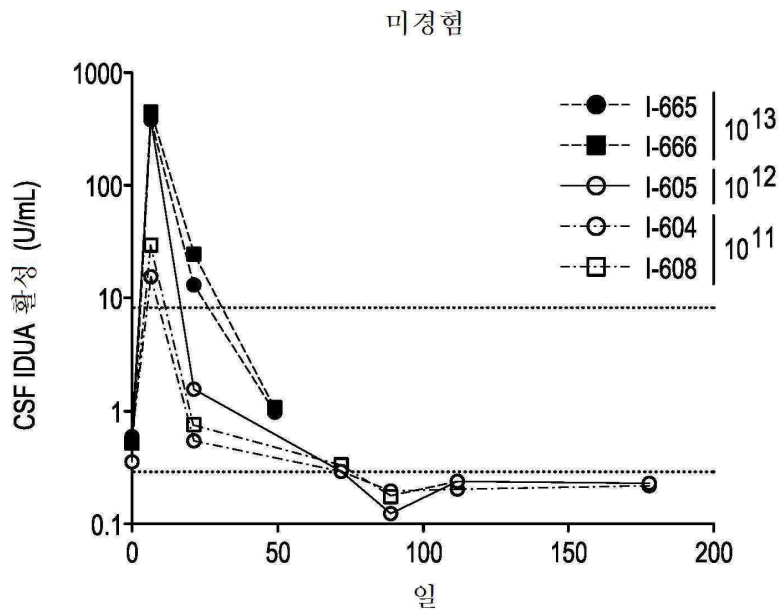
[0762]

도면

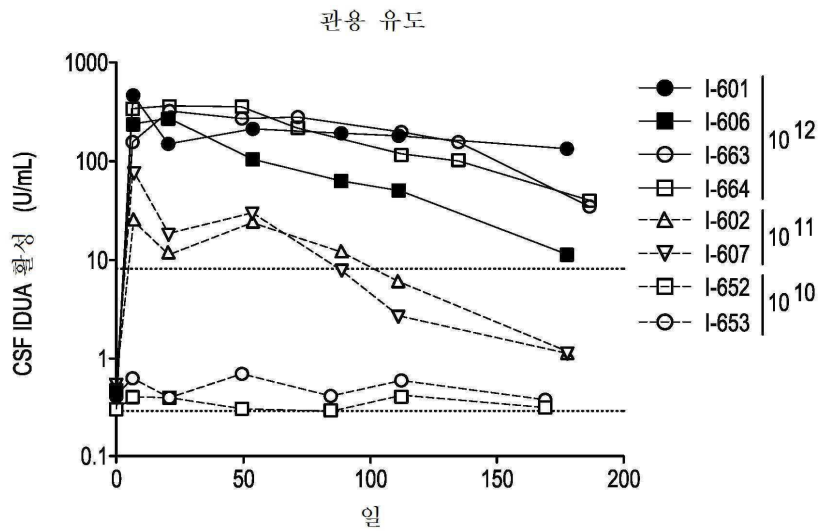
도면1



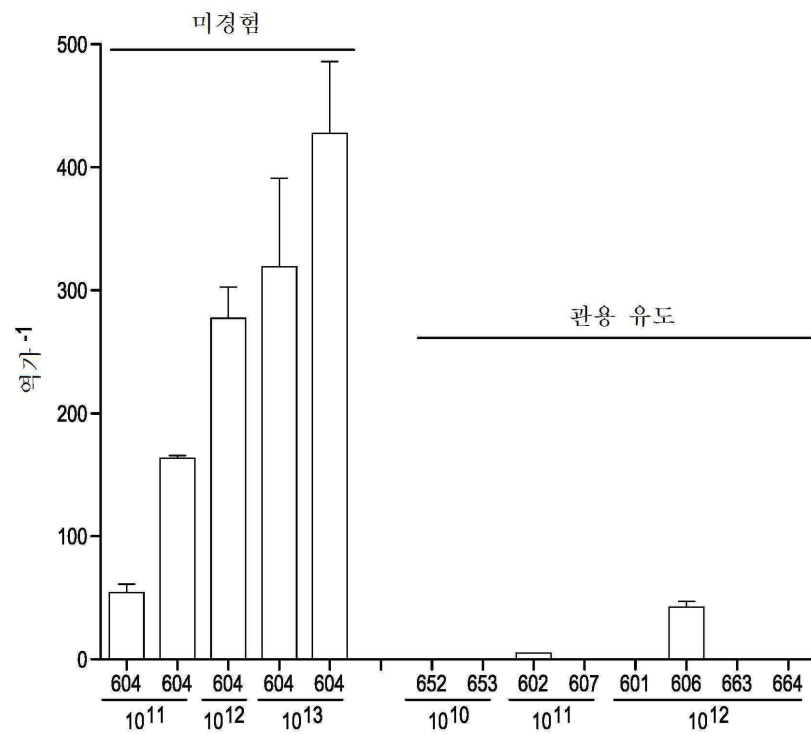
도면2a



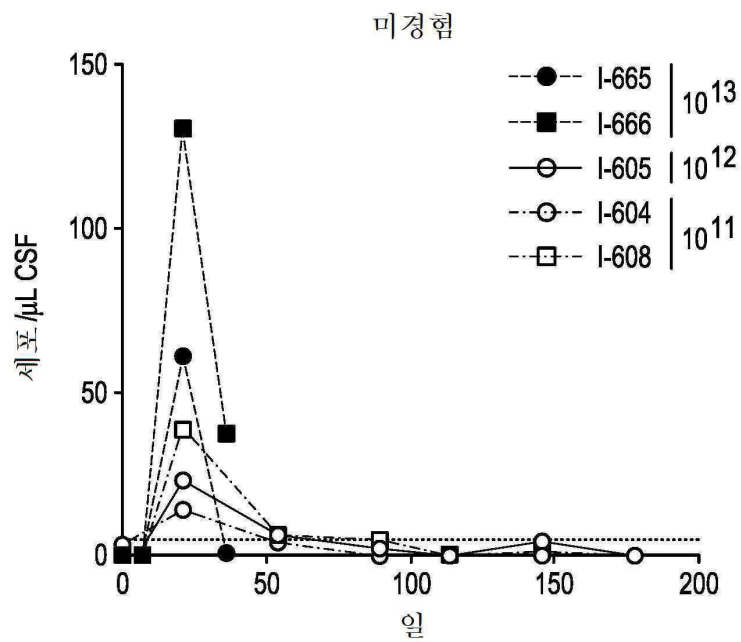
도면2b



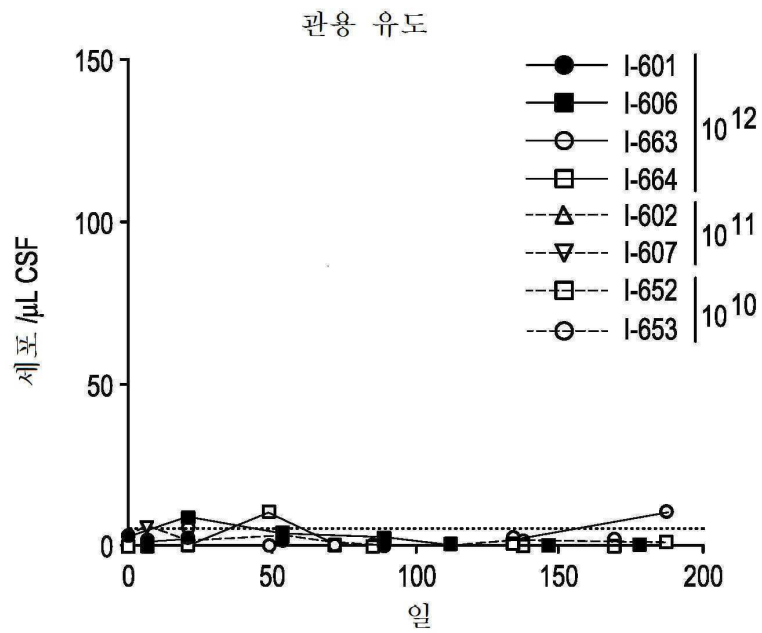
도면3



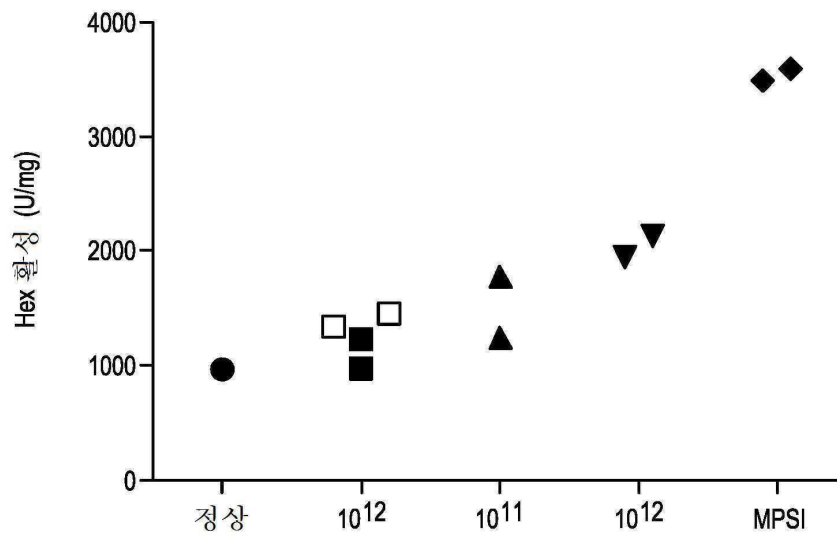
도면4a



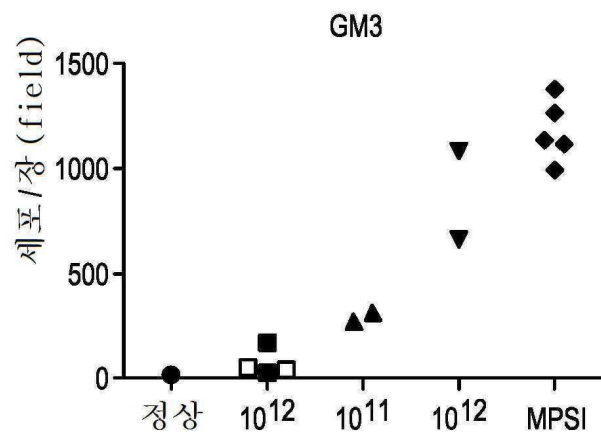
도면4b



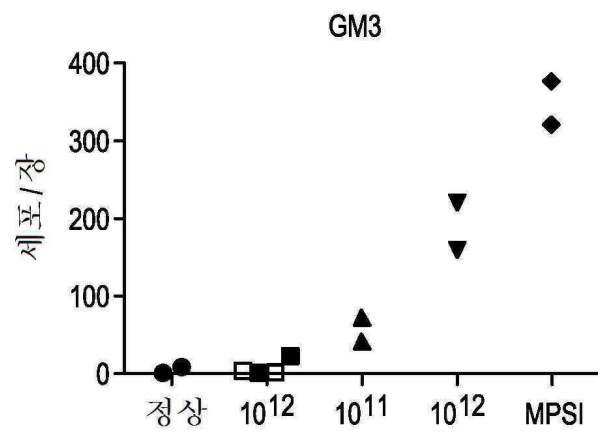
도면5



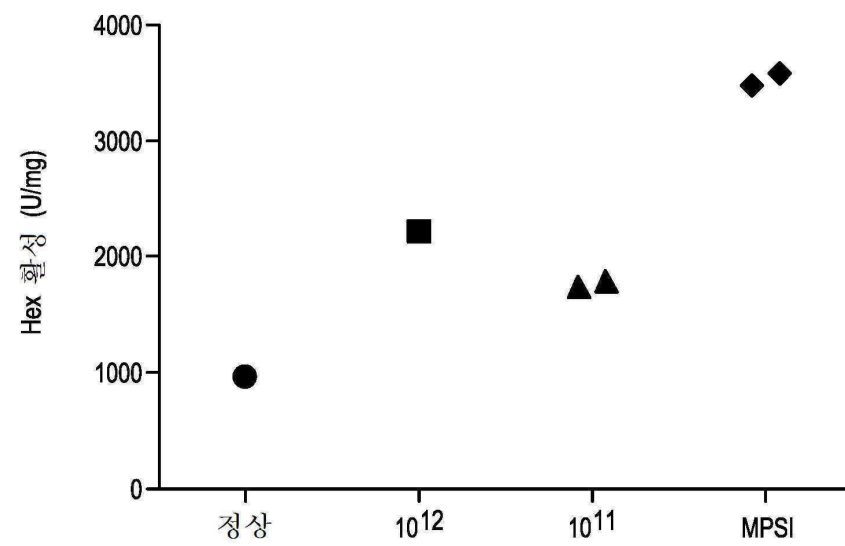
도면6a



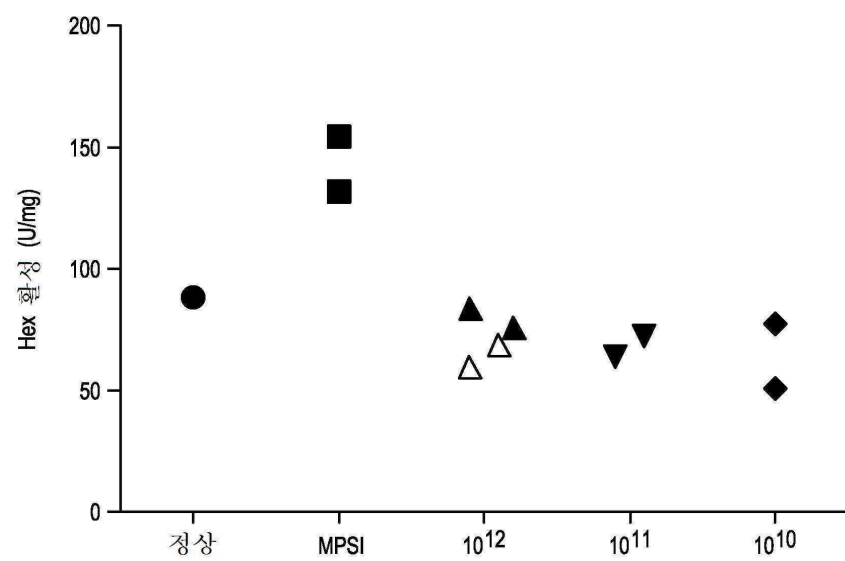
도면6b



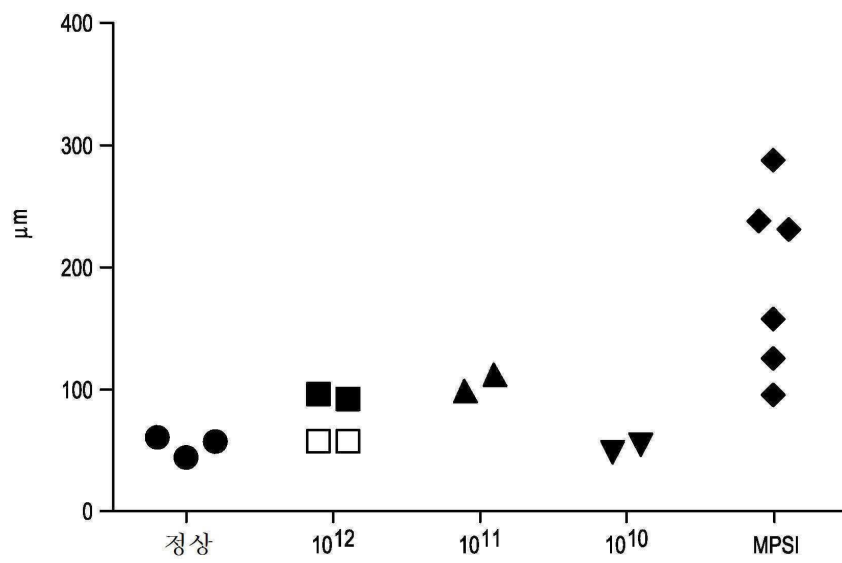
도면7



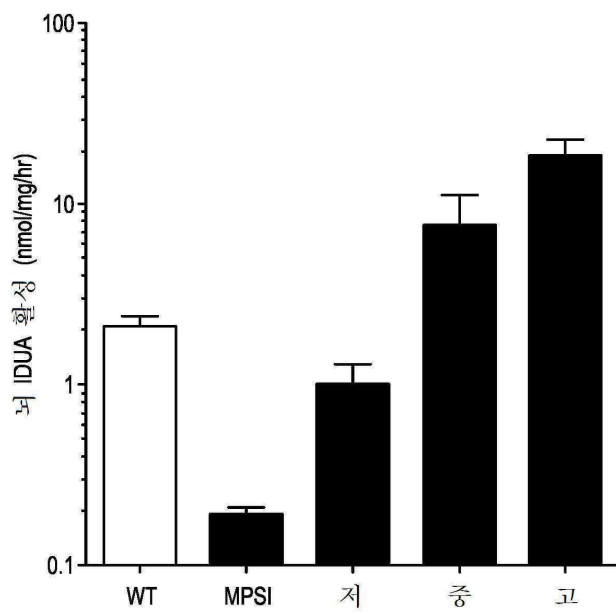
도면8



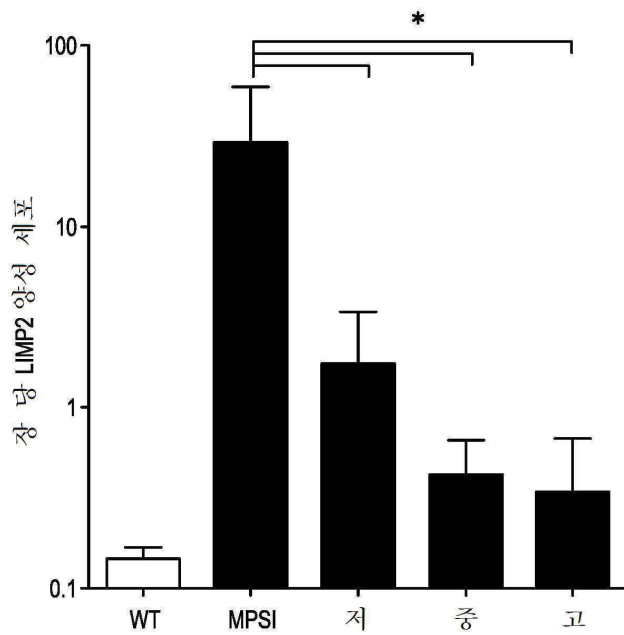
도면9



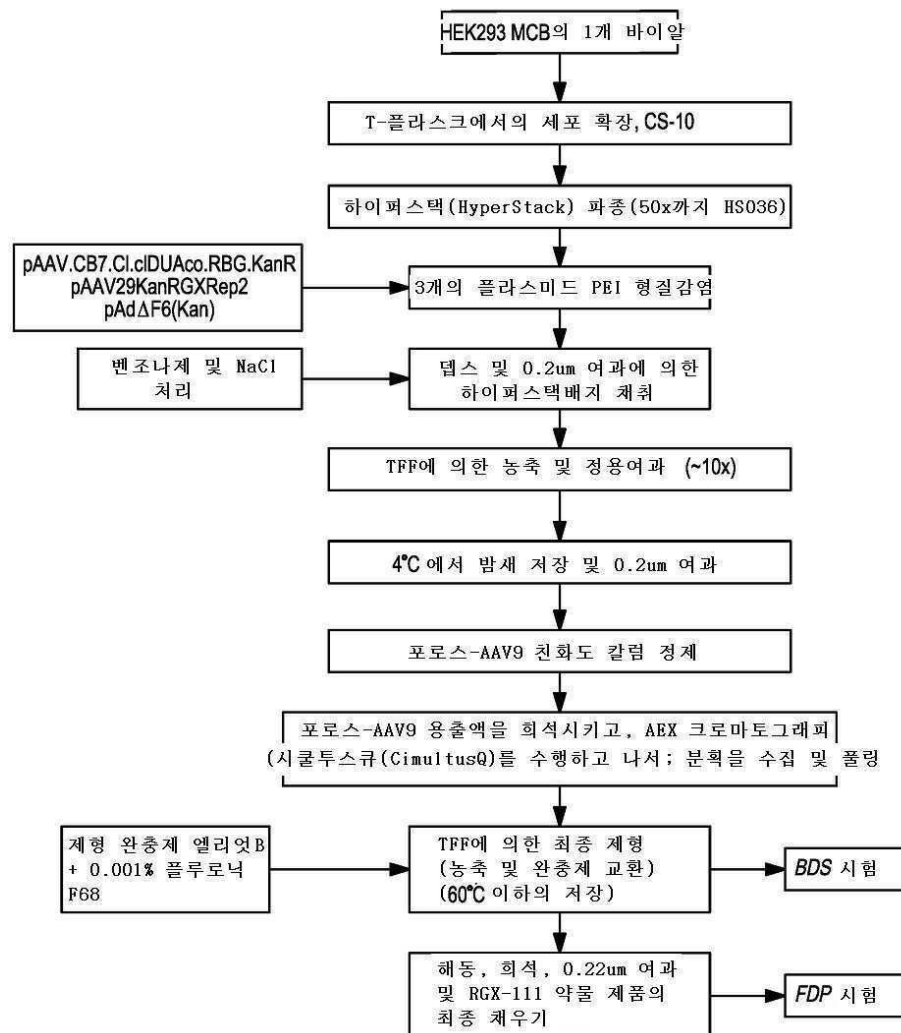
도면10a



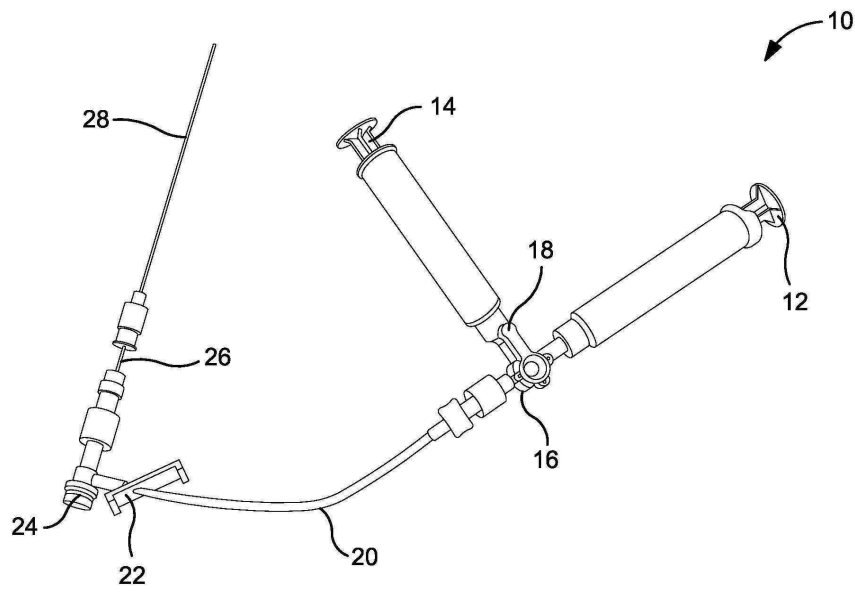
도면10b



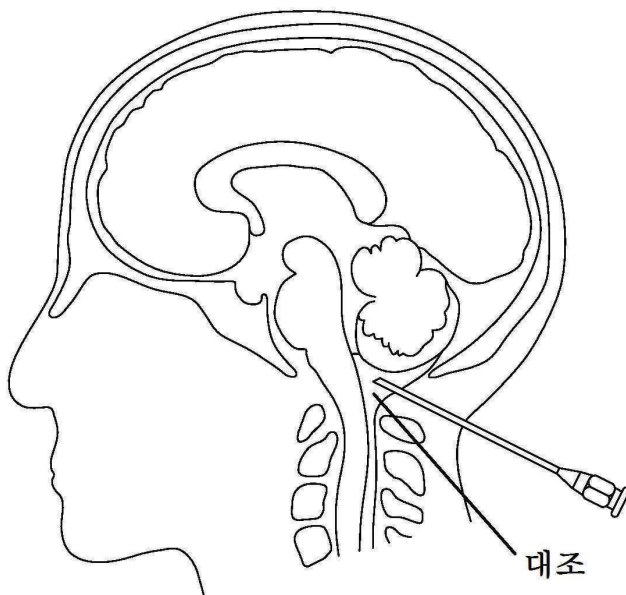
도면11



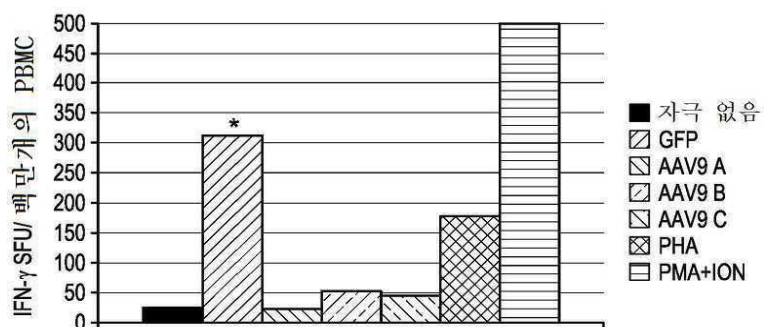
도면12



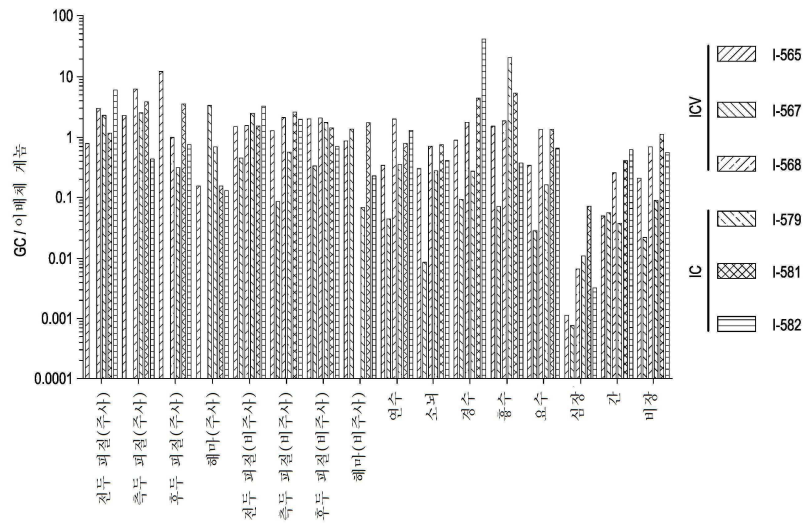
도면13



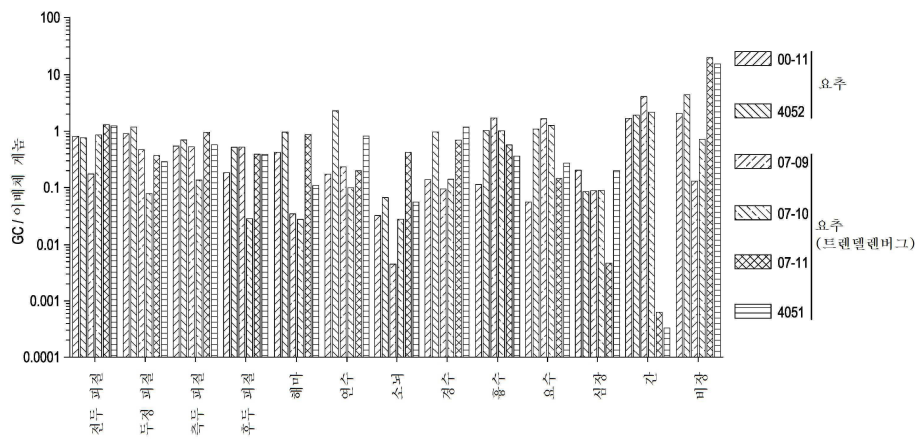
도면14



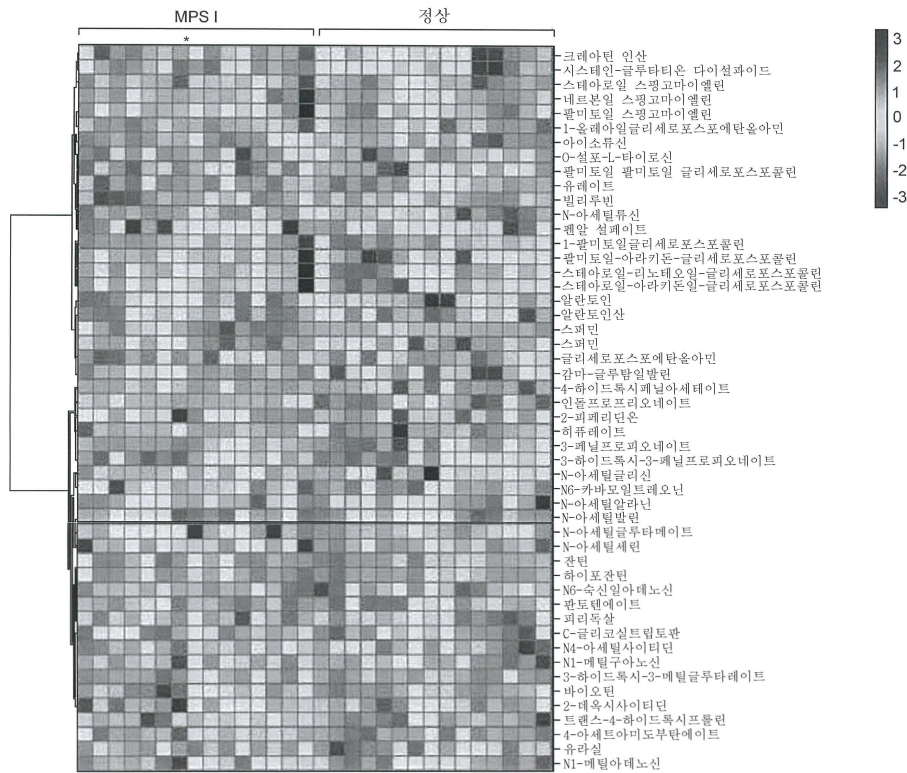
도면15



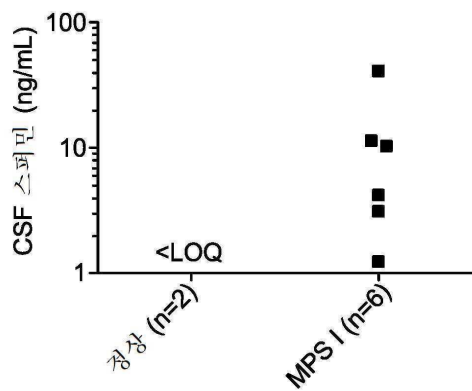
도면16



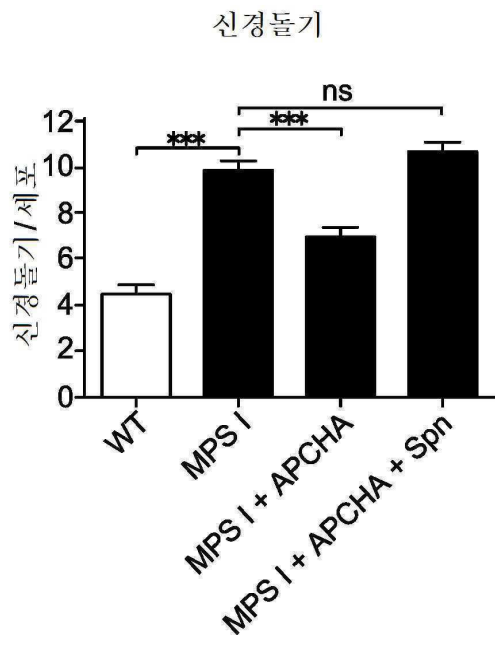
도면17a



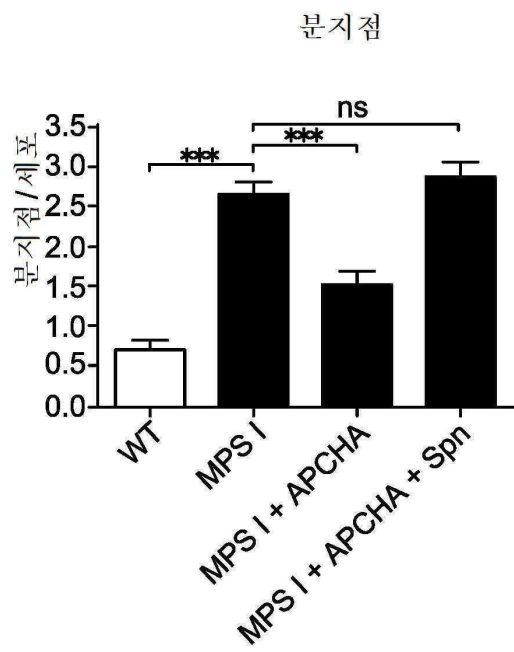
도면17b



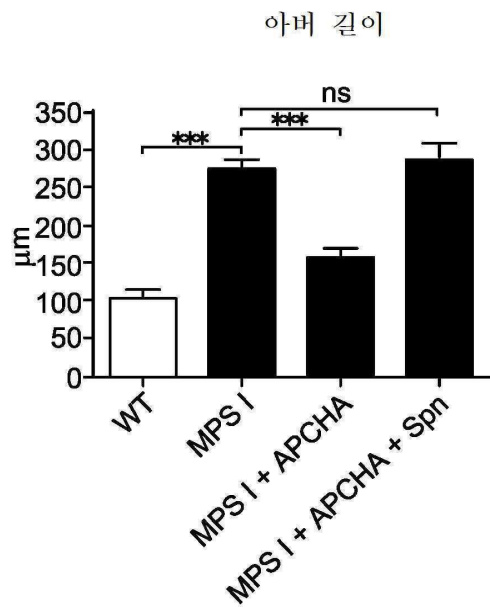
도면18a



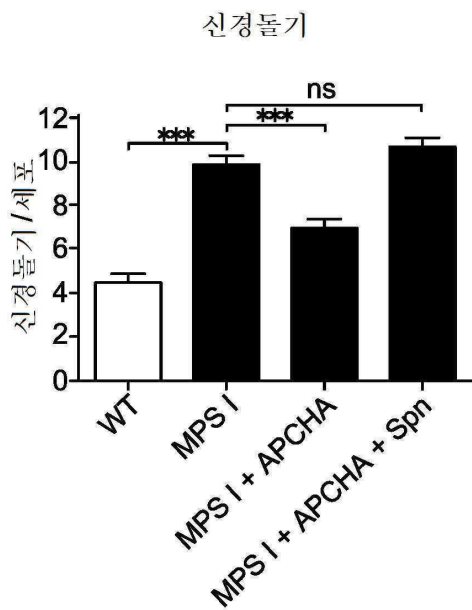
도면18b



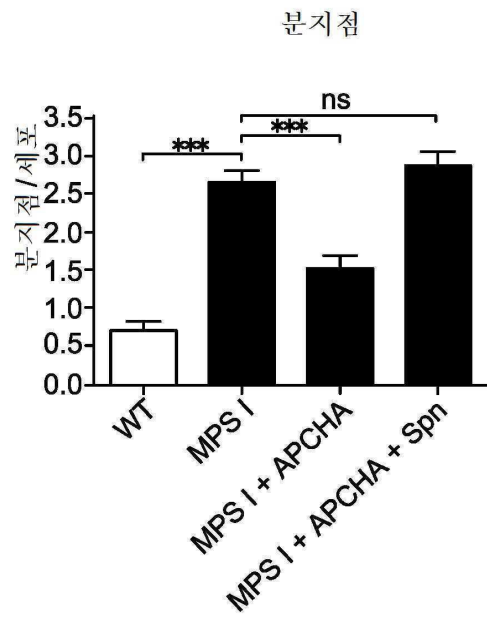
도면18c



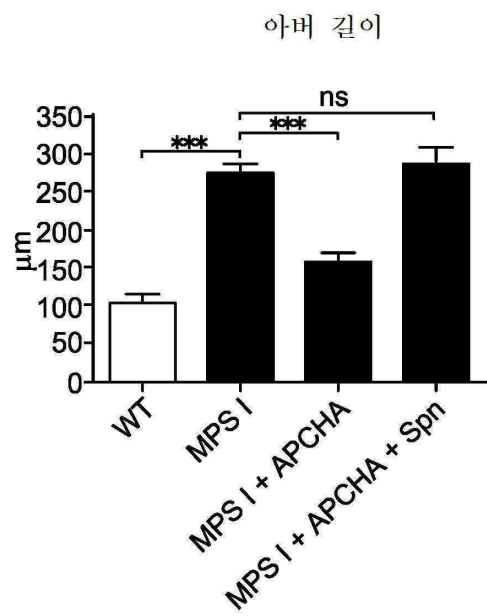
도면18d



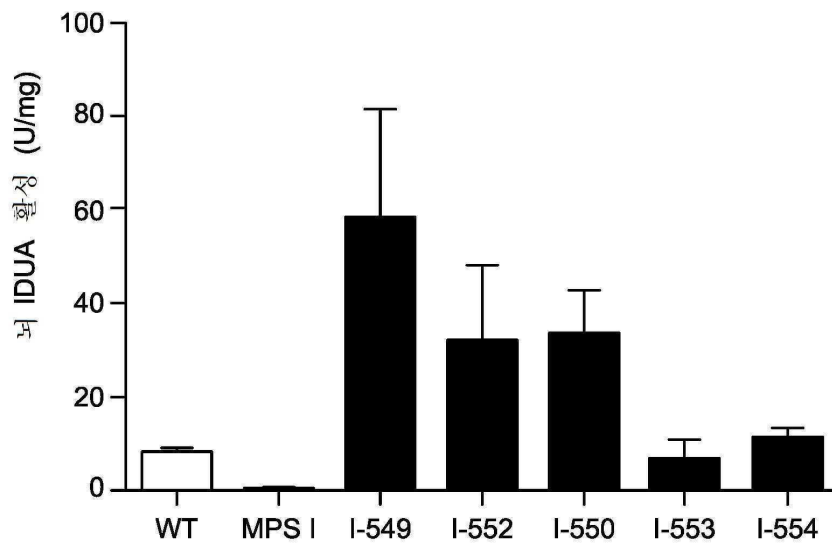
도면18e



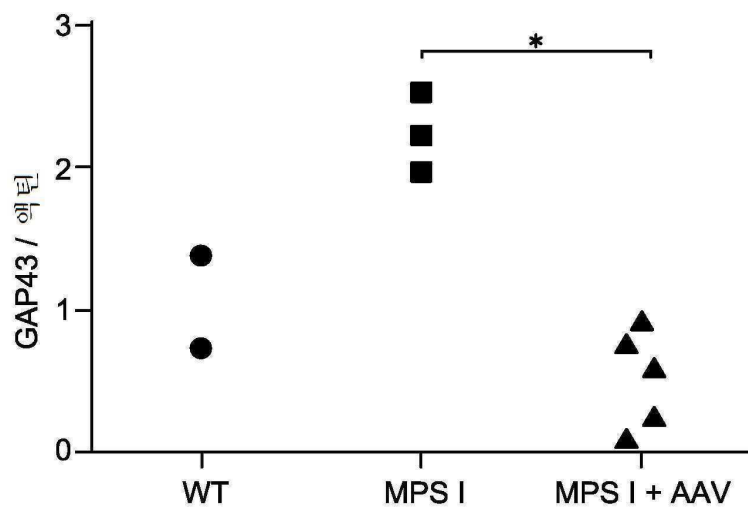
도면18f



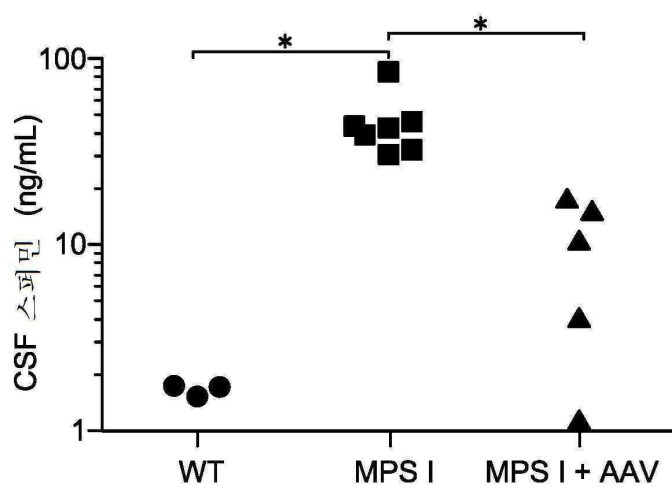
도면19a



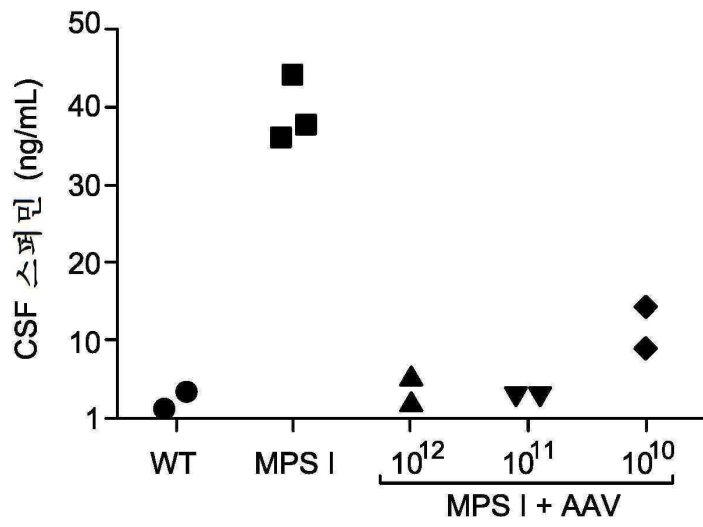
도면19b



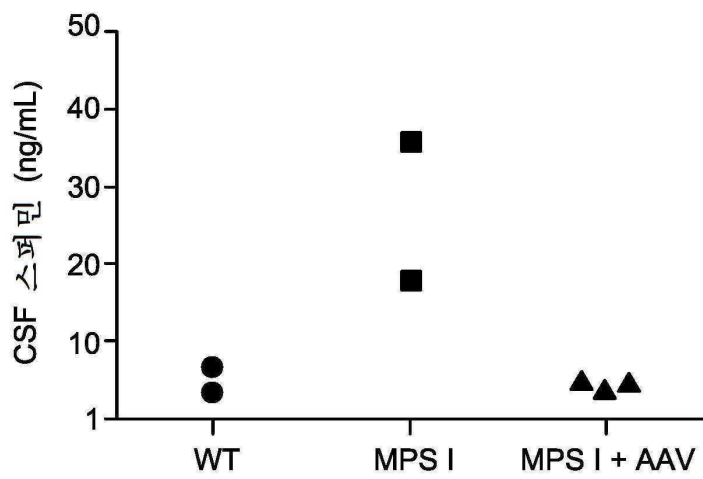
도면19c



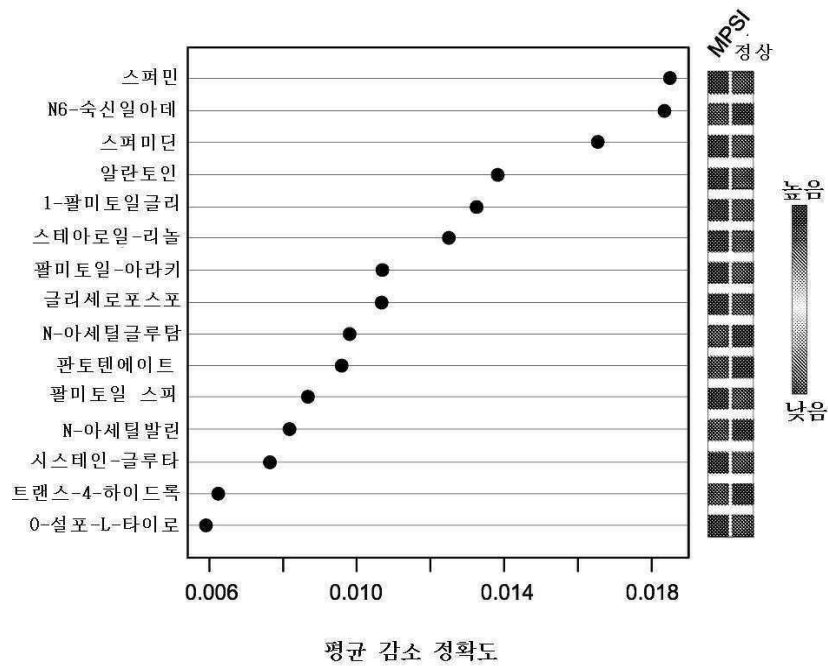
도면20a



도면20b

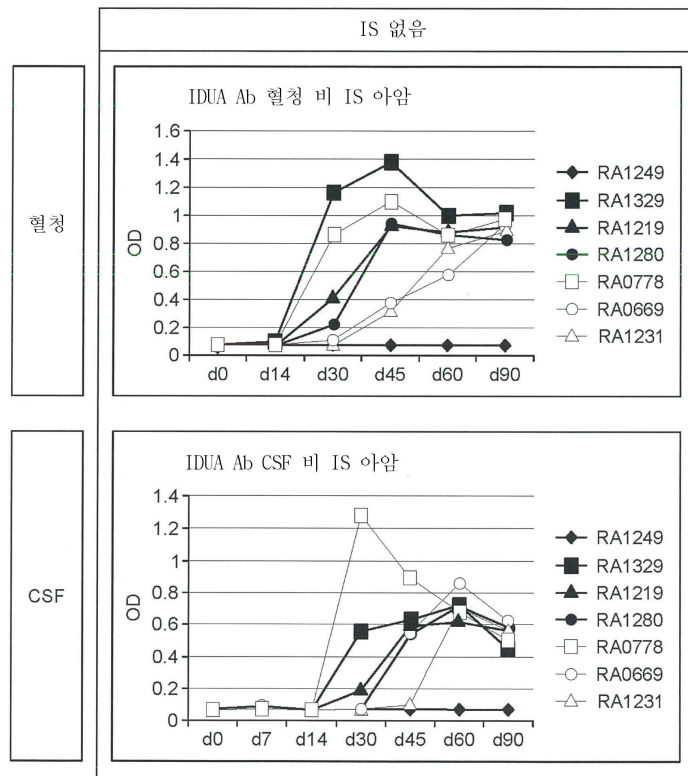


도면21



도면22a

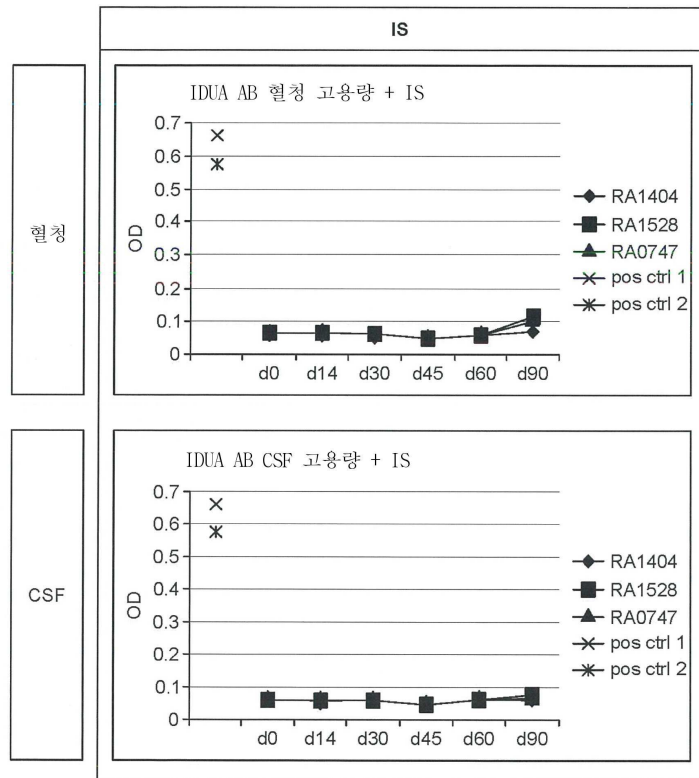
AAV9.hIDUA: NHP 안전성 연구. IDUA에 대한 체액성 면역 반응은 면역 억제에 의해 개선된다



- 1:10,000 희석배수로 검사된 혈청
- 1:20 희석배수로 테스트된 CSF
- 면역 억제 요법 MMF 마이너스 21일 내지 +60일 (36 dpi에서 RA1404 MMF 중단 제외)

도면22b

AAV9.hIDUA: NHP 안전성 연구. IDUA에 대한 체액성 면역 반응은 면역 억제에 의해 개선된다

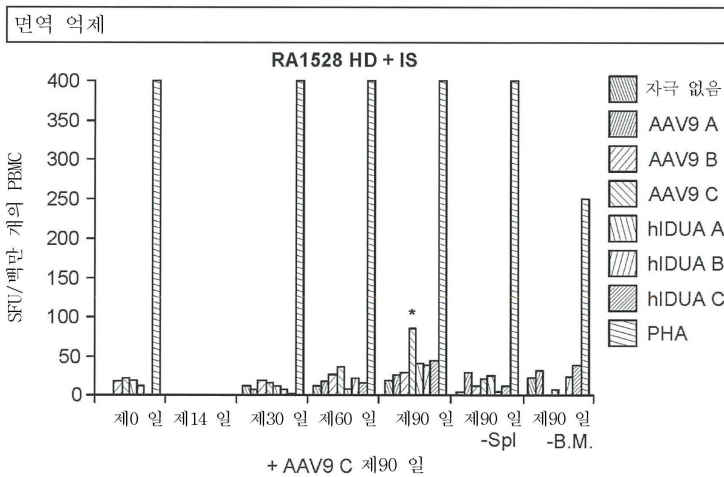
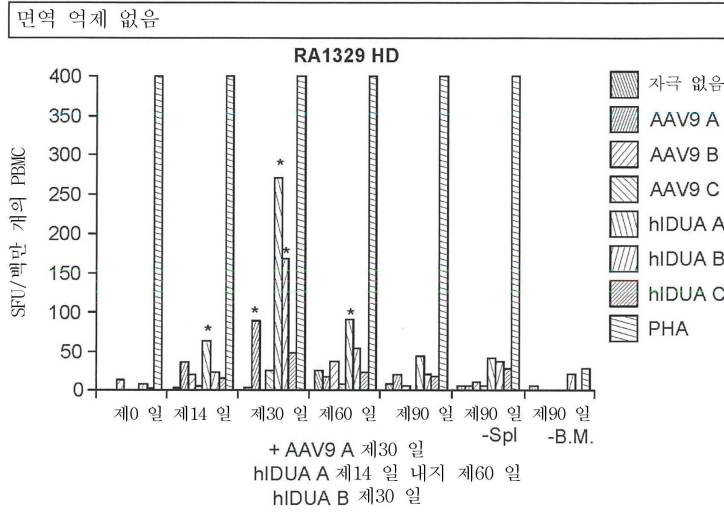


- 1:10,000 희석배수로 검사된 혈청
- 1:20 희석배수로 테스트된 CSF
- 면역 억제 요법 MMF 마이너스 21일 내지 +60일 (36 dpi에서 RA1404 MMF 중단 제외)

도면23a

AAV9.hIDUA: T 세포 면역 반응에 대한 면역 억제의 다양한 영향
(EliSpot: AAV9 및 hIDUA)

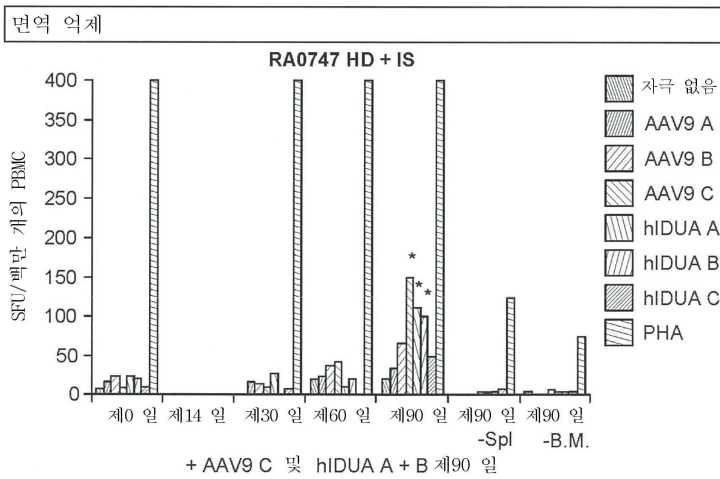
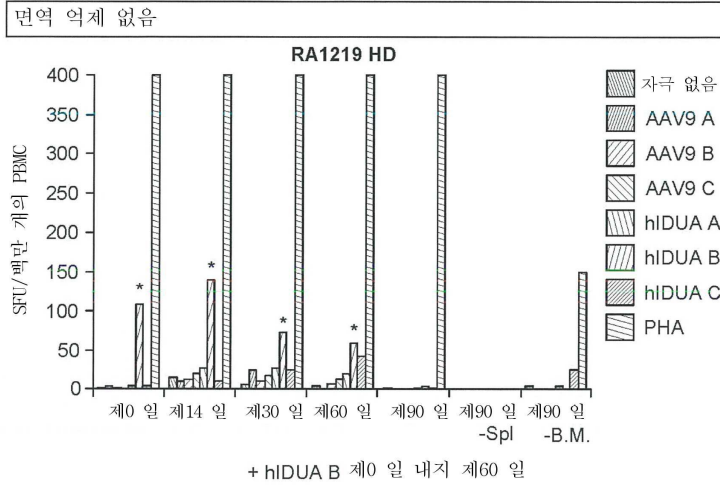
고용량, 면역 억제 유무



도면23b

AAV9.hIDUA: T 세포 면역 반응에 대한 면역 억제의 다양한 영향
(EliSpot: AAV9 및 hIDUA)

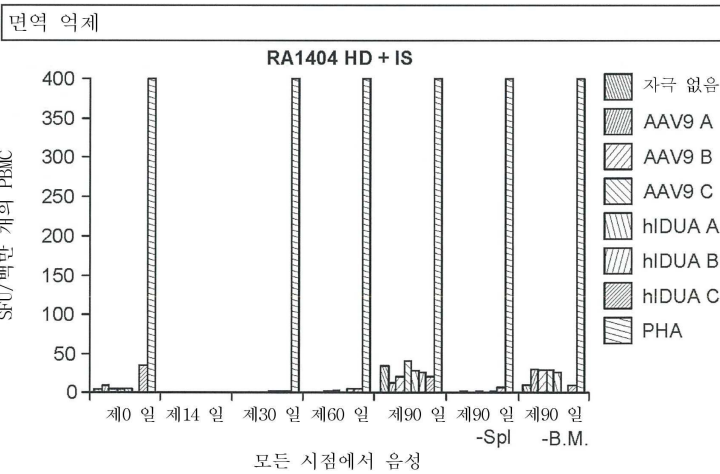
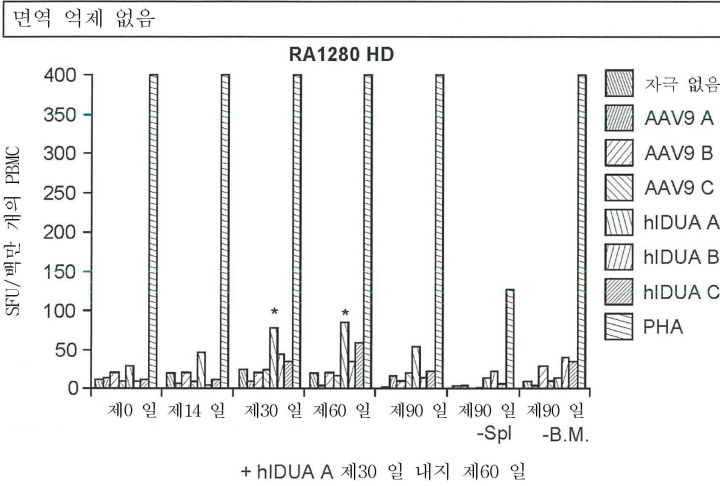
고용량, 면역 억제 유무



도면23c

AAV9.hIDUA: T 세포 면역 반응에 대한 면역 억제제의 다양한 영향
(EliSpot: AAV9 및 hIDUA)

고용량, 면역 억제 유무



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING MPS1

<130> UPN-15-7487C1PCT

<150> 62/616106

<151> 2018-01-11

<150> 62/530614

<151> 2018-07-10

<150> 62/529385

<151> 2017-07-06

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1971

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1971)

<400> 1

atg cgg ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt 48

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

ctg ctg gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg 96

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

cat gtg gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg 144

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

agc acc ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac 192

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

gtg ctg agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg 240

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

ccc cac aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg 288

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

gtg aca acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc 336

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc 384

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115	120	125	
ggc ttc gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac ttc gag			432
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu			
130	135	140	
gac aag cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc			480
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala			
145	150	155	160
aga cgg tac atc ggc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag tgg aac			528
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn			
165	170	175	
ttc gag aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac gtg tca			576
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser			
180	185	190	
atg acc atg cag ggc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc gag ggc			624
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly			
195	200	205	
ctg aga gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg ggc gga ccc ggc gat agc			672
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser			
210	215	220	
ttc cac acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg ggc ctg ctg aga cac			720
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His			
225	230	235	240
tgc cac gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc gag gcc ggc gtg cgg ctg			768
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu			
245	250	255	
gac tac atc agc ctg cac cgg aag ggc gcc aga agc agc atc agc atc			816
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile			
260	265	270	
ctg gaa cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg ttc ccc			864
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro			
275	280	285	

aag ttc gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc ctg gtg	912
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val	
290 295 300	
gga tgg tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac gcc gct	960
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala	
305 310 315 320	
atg gtg gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg gcc aac	1008
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn	
325 330 335	
acc acc agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac gcc ttc	1056
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe	
340 345 350	
ctg agc tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc gcc cgg	1104
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg	
355 360 365	
ttc cag gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag	1152
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys	
370 375 380	
ccc gtg ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag	1200
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln	
385 390 395 400	
ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat	1248
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His	
405 410 415	
aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat	1296
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp	
420 425 430	
gct tgg cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc	1344
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala	
435 440 445	

cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca	1392
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro	
450 455 460	
cca ggc cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg	1440
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu	
465 470 475 480	
tgc agc ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc	1488
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro	
485 490 495	
acc gcc gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct	1536
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala	
500 505 510	
gct gcc cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc	1584
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro	
515 520 525	
gct ctg aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc	1632
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro	
530 535 540	
gag aag cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc	1680
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr	
545 550 555 560	
cag ggc cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag	1728
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys	
565 570 575	
tgc ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac	1776
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr	
580 585 590	
acc ccc gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc	1824
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser	

595	600	605	
ccc gat aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac			1872
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp			
610	615	620	
tac tgg gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa			1920
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu			
625	630	635	640
gtg ccc gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtc gac			1968
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro Val Asp			
645	650	655	
ccg			1971
Pro			

<210> 2
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser			
1	5	10	15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val			
20	25	30	
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg			
35	40	45	
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr			
50	55	60	
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val			
65	70	75	80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu			
85	90	95	
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr			
100	105	110	

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg

355	360	365	
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys			
370	375	380	
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln			
385	390	395	400
Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His			
405	410	415	
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp			
420	425	430	
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala			
435	440	445	
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro			
450	455	460	
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu			
465	470	475	480
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro			
485	490	495	
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala			
500	505	510	
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro			
515	520	525	
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro			
530	535	540	
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr			
545	550	555	560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys			
565	570	575	
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr			
580	585	590	
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser			
595	600	605	

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 3
<211> 4344
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> CB7.CI.hIDUAco.RBG
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(130)
<223> 5"ITR
<220><221> promoter
<222> (198)..(579)
<223> CMV IE promoter
<220><221> promoter
<222> (582)..(863)
<223> CB promoter
<220><221> TATA_signal
<222> (836)..(839)
<220><221> Intron
<222> (956)..(1928)
<223> chicken beta-actin intron

<220><221> CDS
<222> (1990)..(3948)
<223> human IDUA co
<220><221> polyA_signal
<222> (4000)..(4126)
<223> rabbit globin polyA
<220><221> misc_feature
<222> (4215)..(4344)

<400> 3

ctgcgcgtc gctcgtcac tgagccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttctt tgiagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	240
tacggggta ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgacct cggccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggt	420
aactgcccac ttggcagtag atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtag atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgtattacc atggtcgagg tgagccccac	600
gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt attatttat	660
tttttaatta ttttgtcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcgggcgg gccctataa	840
aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgtgc cttcgccccg tgccccgtc	900
cgccggcgcc tcgcgcgcc cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag	960
cggcggggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt	1020
ttcttttctg tggtgcgtg aaagcctga ggggctccgg gagggcctt tgtcgggggg	1080
gagcggctcg gggggtgctg gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgt gcggctccgc	1140
gctgccccgc ggtgtgtagc gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgagtggt	1200
gcgcgagggg agcgcggccg ggggcgggtg ccgcgggtgc ggggggggct gcgaggggaa	1260
caaaggctgc gtgcgggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcgg	1320
cgggctgcaa cccccctgc accccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg	1380
tgccgggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgccgtg ccggcgggg ggtggcgga	1440
ggtgggggtg ccggcgggg cggggccgcc tcgggcccgg gagggctcgg gggaggggcg	1500
cggcggcccc cggagcgccg gcggctgtcg aggcgcggcg agccgcagcc attgcctttt	1560
atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa	1620
atctgggagg cgccgccga cccctctag cggcgcgggg gcgaagcggg gcggcgccgg	1680
caggaaggaa atggcggggg agggccttcg tgcgtcgccg cgccgcgctc cccttctccc	1740
tctccagcct cggggctgtc gcggggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc	1800

ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc 1860
 cttcttcttt ttctacagc tcttgggcaa cgtgctgggt attgtgctgt ctcattcttt 1920

 tggcaaagaa ttcacgcgtg gtacctctag agtcgacccg ggccgcctcg agaattcacg 1980
 cgtgccacc atg cgg ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg 2031
 Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10
 gcc agt ctg ctg gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac 2079
 Ala Ser Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His
 15 20 25 30

 ctg gtg cat gtg gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc 2127
 Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe
 35 40 45
 tgg cgg agc acc ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac 2175
 Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp
 50 55 60
 cag tac gtg ctg agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc 2223

 Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly
 65 70 75
 gcc gtg ccc cac aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg 2271
 Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu
 80 85 90
 gaa ctg gtg aca acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac 2319
 Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn

 95 100 105 110
 ttc acc cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg 2367
 Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu
 115 120 125
 ctg ccc ggc ttc gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac 2415
 Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp

130	135	140	
ttc gag gac aag cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc			2463
Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser			
145	150	155	
ctg gcc aga cgg tac atc ggc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag			2511
Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys			
160	165	170	
tgg aac ttc gag aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac			2559
Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn			
175	180	185	190
gtg tca atg acc atg cag ggc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc			2607
Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser			
195	200	205	
gag ggc ctg aga gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg ggc gga ccc ggc			2655
Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly			
210	215	220	
gat agc ttc cac acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg ggc ctg ctg			2703
Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu			
225	230	235	
aga cac tgc cac gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc gag gcc ggc gtg			2751
Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val			
240	245	250	
cgg ctg gac tac atc agc ctg cac cgg aag ggc gcc aga agc agc atc			2799
Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile			
255	260	265	270
agc atc ctg gaa cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg			2847
Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu			
275	280	285	
ttc ccc aag ttc gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc			2895

Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro
290 295 300
ctg gtg gga tgg tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac 2943
Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr
305 310 315
gcc gct atg gtg gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg 2991
Ala Ala Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu
320 325 330
gcc aac acc acc agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac 3039
Ala Asn Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn
335 340 345 350
gcc ttc ctg agc tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc 3087
Ala Phe Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr
355 360 365
gcc cgg ttc cag gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg 3135
Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu
370 375 380
aga aag ccc gtg ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag 3183
Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu
385 390 395
gaa cag ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc 3231
Glu Gln Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser
400 405 410
aat cat aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc 3279
Asn His Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro
415 420 425 430
gcc gat gct tgg cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc 3327
Ala Asp Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr
435 440 445
aga gcc cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc 3375
Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly

450	455	460	
gtg cca cca ggc cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac			3423
Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn			
465	470	475	
ggc ctg tgc agc ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg			3471
Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val			
480	485	490	
ttc ccc acc gcc gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct			3519
Phe Pro Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro			
495	500	505	510
gtg gct gct gcc cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg			3567
Val Ala Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu			
515	520	525	
agg ccc get ctg aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc			3615
Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala			
530	535	540	
agg ccc gag aag cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc			3663
Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro			
545	550	555	
ctg acc cag ggc cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc			3711
Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly			
560	565	570	
agc aag tgc ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag			3759
Ser Lys Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys			
575	580	585	590
gcc tac acc ccc gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg			3807
Ala Tyr Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val			
595	600	605	
ttc agc ccc gat aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc			3855
Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala			
610	615	620	

ctg gac tac tgg gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac 3903

Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr

625 630 635

ctg gaa gtg ccc gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct 3948

Leu Glu Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

640 645 650

tgagtcgacc cgggcggcct cgaggacggg gtgaactacg cctgaggatc cgatcttttt 4008

ccctctgcc aaaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac ttctggctaa 4068

taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt ttttgtgtct ctcactcgga 4128

agcaattcgt tgatctgaat ttgaccacc cataataccc attaccctgg tagataagta 4188

gcatggcggg ttaatcatta actacaagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc 4248

tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgcac gcccgggctt 4308

tgcccgggcg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcag 4344

<210> 4

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
195 200 205
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350
 Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
 355 360 365
 Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
 370 375 380
 Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

 385 390 395 400
 Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
 405 410 415
 Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
 420 425 430
 Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
 435 440 445
 His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

 450 455 460
 Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
 465 470 475 480
 Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
 485 490 495
 Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
 500 505 510
 Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

 515 520 525
 Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
 530 535 540
 Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
 565 570 575
 Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

 580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 5
<211> 3605
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Vector genome - TBG.PI.hIDUAco.RBG
<220><221> repeat_region
<222> (1)..(130)
<223> 5' ITR
<220><221> enhancer
<222> (221)..(320)
<223> Alpha mic/Bik
<220><221> enhancer
<222> (327)..(426)
<223> Alpha mic/Bik
<220><221> promoter
<222> (442)..(901)
<223> TBG
<220><221> TATA_signal
<222> (885)..(888)
<220><221> Intron
<222> (1027)..(1157)
<220><221> misc_feature
<222> (1251)..(3212)
<223> Human alpha-L-IDUA coding sequence
<220><221> polyA_signal

<222> (3261)..(3387)

<223> rabbit globin poly A

<220><221> repeat_region

<222> (3476)..(3605)

<400> 5

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttct ttagttaa gattaaccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca	240
gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggtaataat	300
ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtc aaagtccaag	360
tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctgggt aataatctca ggagcacaaa	420
cattccagat cggcgcgccc agggctggaa gctaccttg acatcattc ctctgcgaat	480
gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc tttgtacaa	540
ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagtgag aactttttcc	600
tgctgcctct tgggtctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc	660
agcatggact taaaccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag	720
ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcattttttg ctttgttctt	780
cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt	840
aatttataac taagagtgtc ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga	900
tgttgctttc tgagagacag ctttatttgc gtagtttata acagttaaat tgctaacgca	960
gtcagtgtt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagtgtgc gtgaggcact	1020
gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg	1080
tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac	1140
tttgccttcc tctccacagg tgctcactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt	1200
acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atgcggcccc	1260
tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc cctctgttg	1320
cccccgcca agccccctac ctgggtgatg tggatgccgc cagagccctg tggcctctgc	1380
ggagattctg gcggagcacc ggcttttgcc cccactgcc tcacagccag gccgaccagt	1440
acgtgtctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg cccacagag	1500
gcatcaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaactggt gacaaccgg ggctccaccg	1560

gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg ctgagagaga 1620
accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc accgacttcg 1680
aggacaagca gcaagtcttt gagtgggaagg acctggtgtc cagcctggcc agacggtaca 1740
tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaaactt cgagacatgg aacgagccccg 1800
accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac tactacgacg 1860
cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actgggcgga cccggcgata 1920

gcttcacac cccccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac tgccacgacg 1980
gcaccaatth cttcaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc ctgcaccgga 2040
agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc cagcagatcc 2100
ggcagctgtt cccaagtgc gccgacacc ccatctacaa cgacgaggcc gacccccctgg 2160
tgggatggtc actgcctcag ccttggagag ccgacgtgac ctacgccgt atggtggtga 2220
aagtgatgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc ttcccttacg 2280
ccctgctgag caacgacaac gccttcctga gctaccacc ccacccttc gccagagaa 2340

ccctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagaccccc ccacgtgcag ctgctgagaa 2400
agccccgtct gaccgtatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag ctgtgggccg 2460
aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggcgtg ctggcctccg 2520
cccacagacc tcagggacc gccgatgctt ggccgggctgc cgtgctgac tacgccagcg 2580
acgataccag agccccccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg agaggcgtgc 2640
caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatactgga caacggcctg tgcagccccg 2700
acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgccgagcag ttccggcgga 2760

tgagagccgc tgaggatcct gtggtgctg ccctagacc tctgcctgct ggcggcagac 2820
tgacctgag gcccgtctg agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtg tgcgccaggc 2880
ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gcccctgacc cagggccagc 2940
tggtgctggt gtggtccgat gacacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc tacgagatcc 3000
agttcagcca ggacggcaag gcctacacc cgtgtcccg gaagcccagc accttcaacc 3060
tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgcggctc ttatagagtg cgggccctgg 3120
actactgggc cagaccggc cctttcagc acccgtgcc ctacctgaa gtgccgtgc 3180

ctagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gactcgacc gggcggcctc gaggacgggg 3240
tgaaactacg ctgaggatcc gatcttttt cctctgcaa aaattatggg gacatcatga 3300
agccccctga gcatctgact tctggcta ataaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt 3360
gttggaaatt ttgtgtctc tcactcgaa gcaattcggt gatctgaatt tcgaccacc 3420

ataataccca ttaccctggt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa 3480
cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg 3540
cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagttag cgagcgagcg 3600

cgcag 3605

<210> 6
<211> 3691
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> Vector genome: CMV.PI.hIDUAco.SV40
<220><221> repeat_region
<222> (1)..(130)
<223> 5' ITR
<220><221> misc_feature
<222> (143)..(181)
<223> CMV enhancer and promoter
<220><221> TATA_signal
<222> (910)..(916)
<220><221> Intron
<222> (1024)..(1221)
<223> chimeric intron
<220><221> misc_feature
<222> (1284)..(3246)
<223>
> human IDUA coding sequence
<220><221> polyA_signal
<222> (3258)..(3496)
<220><221> repeat_region
<222> (3562)..(3691)
<400> 6

ggccttaatt aggtgcgcg ctcgtctgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg 60
tcgggcgacc tttggtcgcc cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc 120
caactccatc actaggggtt cttttagtgc aatgattaac ccgcatgct acttatctac 180
gtagccatgc tctaggaaga tcttcaatat tggccattag ccatattatt catttggttat 240

atagcataaa tcaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataaatatg	300
tacatttata ttggctcatg tccaatatga cggccatgtt ggcatgtatt attgactagt	360
tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt	420
acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg	480
tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg	540
gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt	600
ccgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgctt ggcatatgc ccagtacatg	660
accttacggg acttttctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg	720
gtgatgcggt ttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt	780
ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac	840
tttcaaaaat gtcgtaataa cccgccccg ttgacgcaa tgggcggttag gcgtgtacgg	900
tgggaggctt atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcactag aagctttatt	960
gcggtagttt atcacagta aattgctaac gcagtcagtg cttctgacac aacagtctcg	1020
aacttaagct gcagaagtig gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa ggttacaaga	1080
caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact cttgcgtttc	1140
tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac aggtgtccac	1200
tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact ataggctagc	1260
ctcgagaatt cacgcgtgcc accatgcggc ccttagggcc tagagctgct ctgctggcac	1320
tgctggccag tctgctggct gcccctctg tggccctgc cgaagccct caccctggtgc	1380
atgtggatgc cgccagagcc ctgtggcctc tgcggagatt ctggcggagc accggctttt	1440
gccccccact gcctcacagc caggccgacc agtacgtgct gagctgggac cagcagctga	1500
acctggccta cgtgggcgcc gtgccccaca gaggcataca acaggtgaga acccactggc	1560
tgctggaact ggtgacaacc cggggctcca cggcagagg cctgagctac aacttcaccc	1620
acctggacgg ctacctggac ctgctgagag agaaccagct gctgcccggc ttcgagctga	1680
tgggcagcgc cagcggccac ttcaccgact tcgaggacaa gcagcaagtc tttgagtgga	1740
aggacctggt gtccagcctg gccagacggt acatcggcag atacggactg gcccacgtgt	1800
ccaagtggaa cttcgagaca tggaacgagc ccgaccacca cgacttcgac aacgtgtcaa	1860
tgaccatgca gggctttctg aactactacg acgcctgctc cgagggcctg agagccgcca	1920
gtcctgccct gagactgggc ggaccggcg atagcttcca cccccccc agaagcccc	1980

tgagctgggg cctgctgaga cactgccacg acggcaccaa tttcttcacc ggcgaggccg 2040
 gcgtgcggct ggactacatc agcctgcacc ggaaggcgcg cagaagcagc atcagcatcc 2100
 tggaacagga aaaggtcgtc gcccgacaga tccggcagct gttccccaag ttcgccgaca 2160
 ccccatcta caacgacgag gccgaccccc tggtagggatg gtcactgcct cagccttga 2220
 gagccgacgt gacctacgcc gctatgggtg tgaaagtgat cggccagcat cagaacctgc 2280
 tgctggccaa caccaccagc gccttccctt acgccctgct gagcaacgac aacgccttcc 2340
 tgagctacca cccccaccc ttcgccaga gaacctgac cggccggttc caggtgaaca 2400

 acaccagacc ccccacgtg cagctgctga gaaagcccgt gctgaccgt atgggactgc 2460
 tggctctgct ggacgaggaa cagctgtggg ccgaagtgtc ccaggccggc accgtgctgg 2520
 acagcaatca tacagtgggc gtgctggcct cggccacag acctcagga cccgccgatg 2580
 cttagcgggc tgcctgctg atctaccca gcgacgatac cagagccac cccaacagat 2640
 ccgtggccgt gaccctgcgg ctgagaggcg tgccaccagg ccctggactg gtgtacgtga 2700
 ccagatacct ggacaacggc ctgtgcagcc ccgacggcga atggcgaga ctgggcagac 2760
 ctgtgttccc caccgccgag cagttccggc ggatgagagc cgctgaggat cctgtggctg 2820

 ctgcccctag acctctgcct gctggcggca gactgacct gaggcccgt ctgagactgc 2880
 ctagtctgct gctggtgcac gtgtcgcca ggcccagaa gcctcccgc caggtgacaa 2940
 gactgagagc cctgcccctg acccagggcc agctgggtct ggtgtgttcc gatgagcacg 3000
 tgggcagcaa gtgcctgtgg acctacaga tccagttcag ccaggacggc aaggcctaca 3060
 ccccgctgtc ccggaagccc agcaccttca acctgttctg gttcagcccc gatacaggcg 3120
 ccgtgtccgg ctcttataga gtgcggggcc tggactactg ggccagacc ggcccttca 3180
 gcgaccccgt gccctacctg gaagtgcggc tgccatagg ccccctagc cccggcaacc 3240

 cttagtgca cccggcggc cgcttcgagc agacatgata agataattg atgagtttg 3300
 acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaa atgctttatt tgtgaaattt gtgatgctat 3360
 tgctttatgtt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca attgcattca 3420
 ttttatgttt caggttcagg gggagatgtg ggaggttttt taaagcaagt aaaacctcta 3480
 caaatgtggt aaaatcgata aggatcttcc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg 3540
 gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc 3600
 gcgtcgcctc gtcactgag gccggcgac caaaggtcgc ccgacgccg ggctttgccc 3660

 gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca g 3691

<210> 7

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> hu14/Adeno-associated virus 9

<400> 7

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

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

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile

305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn

325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu

340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

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

 545 550 555 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

 610 615 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735