(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011933
(43) 공개일자 2025년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7041243
(22) 출원일자(국제) 2023년05월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/067013
(87) 국제공개번호 WO 2023/225481
국제공개일자 2023년11월23일
(30) 우선권주장
63/342,590 2022년05월16일 미국(US)
63/459,564 2023년04월14일 미국(US)

(71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
라마찬드란, 시암
미국 02141 매사추세츠 캠브리지 워터 스트리트 450 사노피 페이턴트 디파트먼트 내
(74) 대리인
양영준, 임근실

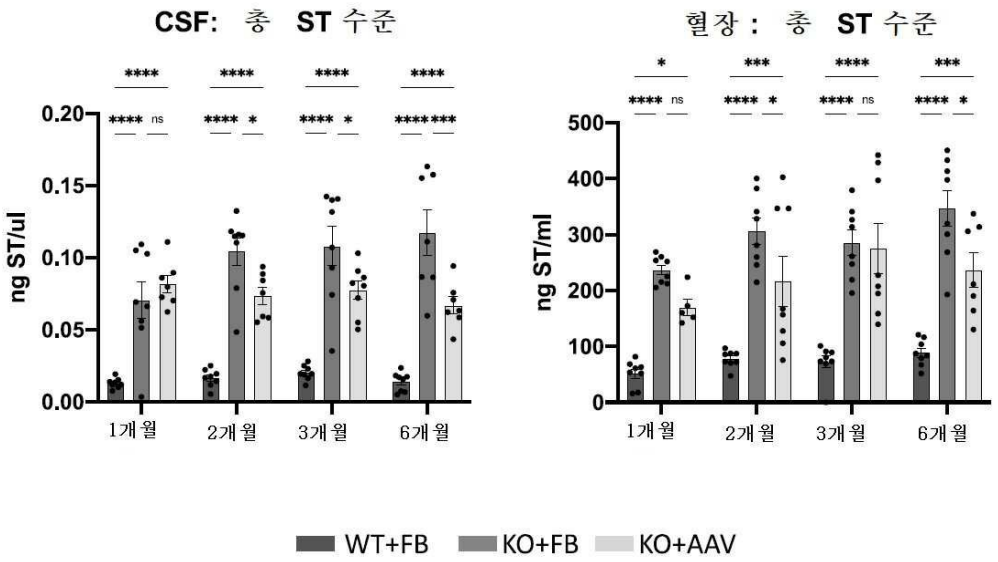
전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 **이염색성 백질이영양증의 치료 방법**

(57) 요 약

간 세포에서 이식유전자를 발현시키기 위한 발현 카세트가 본 명세서에 제공되되, 이식유전자는 ARSA 폴리펩타이드를 암호화한다. 또한 이염색성 백질이영양증(MLD)을 치료하는 방법이 제공된다. 추가로 ARSA 폴리펩타이드의 발현을 필요로 하는 개체에서 이를 발현시키기 위한 벡터(예를 들어, rAAV 벡터), 바이러스 입자, 약제학적 조성물, 및 키트가 본 명세서에 제공된다.

대 표 도 - 도27



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 9/16 (2013.01)
C12Y 301/06001 (2013.01)
C12N 2750/14122 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자로서, (1) 아릴설파타제 A(ARSA) 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함하되, 상기 발현 카세트는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자 및 선택적으로 인핸서를 포함하는, rAAV 벡터, 및 (2) 서열번호 10을 갖는 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ARSA 폴리펩타이드는 서열번호 1을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 표적화 펩타이드는 N-말단 단부 및 C-말단 단부 상에서 링커 서열에 측접된, rAAV 입자.

청구항 4

제3항에 있어서, 조합된 표적화 펩타이드와 링커 서열은 서열번호 11을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 캡시드 단백질은 서열번호 12와 적어도 98.5% 동일한 서열을 갖는, rAAV 입자.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 변형된 캡시드 단백질은 서열번호 12를 포함하는 서열을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 2의 코돈 최적화된 ARSA 유전자를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 서열번호 4의 5' AAV2 ITR 및 서열번호 5의 3' AAV2 ITR을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 6을 포함하는 CMV 인핸서 요소를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 7을 포함하는 닭 b-액틴 프로모터를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 WPRE 요소를 더 포함하는, rAAV 입자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 WPRE 요소는 서열번호 8의 서열을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 서열번호 16의 서열을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 14

이염색성 백질이영양증(MLD; metachromatic leukodystrophy)의 치료를 필요로 하는 인간 환자의 이염색성 백질이영양증을 치료하는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 포함하는 조성물을 상기 환자의 뇌척수액(CSF)에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물은 뇌실내(ICV) 투여를 통해 상기 환자의 CSF에 직접 투여되는, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 조성물은 직접 거대 수조(dCM) 투여를 통해 상기 환자의 CSF에 직접 투여되는, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 조성물은 척추강내 마이크로카테터(IT-CM)에 의해 상기 환자의 CSF에 직접 투여되는, 방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 환자의 생애에 걸쳐 1회만 투여되는, 방법.

청구항 19

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 환자에게 1년에 1회만 투여되는, 방법.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 상기 환자에서 ARSA 활성을 적어도 5% 증가시키는, 방법.

청구항 21

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 상기 환자에서 ARSA 활성을 적어도 10% 증가시키는, 방법.

청구항 22

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 상기 환자에서 ARSA 활성을 적어도 20% 증가시키는, 방법.

청구항 23

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 상기 환자에서 ARSA 활성을 적어도 30% 증가시키는, 방법.

청구항 24

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 상기 환자에서 ARSA 활성을 적어도 50% 증가시키는, 방법.

청구항 25

ARSA의 발현 및/또는 활성 증가를 필요로 하는 개체의 ARSA의 발현 및/또는 활성을 증가시키는 방법으로서, 유효량의 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 포함하는 조성

물을 상기 환자의 뇌척수액(CSF)에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

서열번호 3을 포함하는 플라스미드.

청구항 27

서열번호 2를 포함하는 코돈 최적화된 인간 ARSA 서열.

청구항 28

서열번호 2를 포함하는 코돈 최적화된 인간 ARSA 서열을 포함하는, 발현 카세트.

청구항 29

제28항에 있어서, 서열번호 7을 포함하는 닭 b-액틴 프로모터를 더 포함하는, 발현 카세트.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 서열번호 6을 포함하는 CMV 인핸서 요소를 더 포함하는, 발현 카세트.

청구항 31

제27항 내지 제30항 중 어느 하나의 발현 카세트를 포함하는, 벡터.

청구항 32

제31항에 있어서, 서열번호 8을 포함하는 WPRE 요소를 더 포함하는, 벡터.

청구항 33

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 rAAV 입자를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 34

제33항의 약제학적 조성물을 포함하는, 키트.

청구항 35

MLD를 치료하는 데 사용하기 위한 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자로서, (1) 아릴설파타제 A(ARSA) 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함하되, 상기 발현 카세트는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자 및 선택적으로 인핸서를 포함하는 발현 카세트를 포함하는, rAAV 벡터, 및 (2) 서열번호 10을 갖는 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 아데노-연관 바이러스 입자.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 ARSA 폴리펩타이드는 서열번호 1을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 표적화 펩타이드는 N-말단 단부 및 C-말단 단부 상에서 링커 서열에 측접된, rAAV 입자.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 조합된 표적화 펩타이드 및 링커 서열은 서열번호 11을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 AAV9 캡시드 단백질은 변형된 VP3 캡시드 단백질인, rAAV 입자.

청구항 40

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 VP3 캡시드 단백질은 서열번호 12와 적어도 98.5% 동일한 서열을 갖는, rAAV 입자.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 변형된 VP3 캡시드 단백질은 서열번호 12를 포함하는 서열을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 42

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질은 비변형된 AAV9 캡시드 단백질인, rAAV 입자.

청구항 43

제35항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 2의 코돈 최적화된 ARSA 유전자를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 44

제35항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 서열번호 4의 5' AAV2 ITR 및 서열번호 5의 3' AAV2 ITR을 포함하는, rAAV 입자.

청구항 45

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 6을 포함하는 CMV 인핸서 요소를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 46

제35항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 서열번호 7을 포함하는 닭 b-액틴 프로모터를 포함하는, rAAV 입자.

청구항 47

제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 WPRE 요소를 더 포함하는, rAAV 입자.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 WPRE 요소는 서열번호 8을 포함하는 서열을 갖는, rAAV 입자.

청구항 49

제35항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV 벡터는 서열번호 16을 포함하는 서열을 갖는, rAAV 입자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 5월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/342,590호, 및 2023년 4월 14일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/459,564호의 우선권 유익을 주장하며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 이들의 전문이 참조에 의해 원용된다.

[0003] 전사 서열목록에 대한 참조

[0004] 전자 서열목록의 내용(159792018440seqlist.xml; 용량: 36,314 바이크; 및 생성일: 2023년 5월 8일)은 이들 전체가 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0005] 본 발명의 기술분야

[0006] 본 개시내용은 아릴설파타제 A를 암호화하는 벡터(*ARSA*)를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 환자의 뇌척수액(CSF)에 투여하는 단계를 포함하는, 이염색성 백질이영양증(MLD; metachromatic leukodystrophy)의 치료를 필요로 하는 환자의 이염색성 백질이영양증의 치료 방법을 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 이염색성 백질이영양증(MLD)은 효소 아릴설파타제 A(ARSA)에서 돌연변이에 의해 야기되는 상염색체 열성 신경퇴행성 장애이다. ARSA 활성의 수준 감소는 중추 및 말초 신경계에서 수초-형성 세포(희소돌기아교세포 및 슈반세포)의 변성을 특징으로 하는 설파타이드의 독성 축적을 초래한다. 이는 탈수초화, 기능장애, 뉴런의 퇴행 및 신경염증(성상세포증, 미세교세포 활성화)을 초래한다. 임상 증상은 주로 신경계에서 나타나서, 지적장애, 정서 및 행동 문제, 운동 기술(움직이기, 말하기, 연하)의 상실, 불량한 근육 기능 및 마비, 실명, 청력 상실 및 발작을 초래한다.

[0008] MLD의 현재의 치료법은 동종이형 골수 이식을 수반하는 자가 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation; HSCT)을 수반한다.

발명의 내용

[0009] 일부 양상에서, 본 발명은 효소 아릴설파타제 A(ARSA)를 암호화하는 벡터(본 명세서에서 ARSA 폴리펩타이드로도 지칭됨)를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 환자의 뇌척수액(CSF)에 투여하는 단계를 포함하는, 이염색성 백질이영양증(MLD)의 치료를 필요로 하는 환자의 이염색성 백질이영양증을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 뇌실내(ICV) 투여, 직접 거대 수조(dCM) 투여 또는 척추강내 마이크로카테터(IT-CM)를 통해 CSF에 직접 투여된다.

[0010] 본 발명은 (a) 아릴설파타제 A(ARSA) 폴리펩타이드를 암호화하는 발현 카세트를 포함하는 rAAV 벡터 및 (b) 중추 신경계(CNS)의 세포를 형질도입할 수 있는 캡시드를 포함하는, rAAV 바이러스 입자의 개발에 적어도 부분적으로 기반한다. CSF에 바이러스 입자의 투여는 뇌에서의 ARSA 단백질의 높은 발현 수준을 제공한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 입자의 발현 카세트는 MLD를 치료하기 위해 중추 신경계 및 말초 신경계에서 이식유전자 발현을 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 서열번호 2의 ARSA 유전자를 포함한다. 일부 실시형태에서, ARSA 유전자는 서열번호 1을 갖는 ARSA 폴리펩타이드를 발현시킨다.

[0011] 일부 양상에서, 본 발명은 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자를 제공하되, rAAV 벡터는 중추 신경계 및 말초 신경계에서 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함하고, 발현 카세트는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 이식유전자 및 선택적으로 인핸서를 포함하고, 이식유전자는 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하고, AAV 바이러스 입자는 중추 신경계(CNS)의 세포를 형질도입할 수 있는 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드 단백질은 AAV9 캡시드 단백질(서열번호 9)이다. 일부 실시형태에서, rAAV의 캡시드는 변형된 AAV9 캡시드 단백질이다. 일부 실시형태에서, rAAV의 캡시드는 AAV.rh10 캡시드 단백질이다. 일부 실시형태에서, ARSA 유전자는 서열번호 1을 갖는 ARSA 폴리펩타이드를 발현시킨다.

[0012] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 rAAV 입자를 뇌에 표적화하는 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 ARSA 폴리펩타이드의 CSF 내 투여를 위한 rAAV 입자를 제공한다. 이러한 변형된 AAV9 캡시드는 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용되는 국제 특허 출원 공개 WO 2021/102234 A1에 기재되어 있다. 추가 실시형태에서, 변형된 AAV9 캡시드의 표적화 펩타이드는 AAV9 구조 단백질의 잔기 588 뒤에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드는 서열번호 10을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드는 표적화 펩타이드의 N-말단 및 C-말단 단부 상에서 링커 서열에 측접된다. 일부 실시형태에서, N-말단 측면 상의 링커 서열은 서열 AAA를 갖는다. 일부 실시형태에서, C-말단 측면 상의 링커 서열은 AS이다. 일부 실시형태에서, AAV9 캡시드 구조 단백질의 잔기 588 다음에 삽입된 전체 서열은 서열번호 11을 갖는다. 일부 실시형태에서, 전체 변형된 AAV9 캡시드 구조 단백질(VP1)은 서열번호 12를 갖는다. 서열번호 12를 갖는 캡시드 단백질은 본 명세서에서 AAV1999로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 전체 변형된 AAV9 캡시드 구조 단백질은 서열번호 12와 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.8%) 동일하되, 변형된 AAV9 구조적 캡시드는 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함한다.

[0013] 본 명세서에 개시된 바와 같은 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 입자는 3개의 구조적 캡시드

단백질, 즉, VP1, VP2 및 VP3을 포함한다. 3개의 캡시드 단백질은 대안의 스플라이스 변이체이다. 전장 VP1 단백질은 서열번호 9의 서열을 갖는다. VP2 단백질은 서열번호 9의 아미노산 138 내지 736을 포함한다. VP3 단백질은 서열번호 9의 아미노산 203 내지 736을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(서열번호 10)는 rAAV 입자에서 AAV9 VP3 캡시드 단백질에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(서열번호 10)는 rAAV 입자에서 AAV9 VP2 캡시드 단백질에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(서열번호 10)는 rAAV 입자에서 AAV9 VP1 캡시드 단백질에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(서열번호 10)는 rAAV 입자 내에서 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 변형된 AAV9 캡시드 단백질에서 표적화 펩타이드는 표적화 펩타이드의 N-말단 및 C-말단 단부 상에서 링커 서열에 측접된다. 일부 실시형태에서, N-말단 측면 상의 링커 서열은 서열 AAA를 갖는다. 일부 실시형태에서, C-말단 측면 상의 링커 서열은 AS이다.

[0014] 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 입자가 대상체의 뇌에 투여(예를 들어, CSF 내 투여) 후 매우 높은 수준의 이식유전자 발현을 나타낸다는 것이 발견되었다. 예를 들어, 서열번호 12를 갖는 변형된 VP1 캡시드 단백질(및/또는 서열번호 13을 갖는 변형된 VP2 캡시드 단백질 및/또는 서열번호 14를 갖는 변형된 VP2 캡시드 단백질)을 포함하는 rAAV 입자는 rAAV 입자의 CSF 내 투여 후, CNS의 세포를 형질도입할 수 있는 다른 캡시드를 포함하는 rAAV 입자, 예를 들어 AAV9 및 AAV.rh10 보다 뇌 및 척수에서 더 높은 수준의 이식유전자 발현을 나타낸다. 대조적으로, 심장 및 간과 같은 다른 기관에서 발현되는 이식유전자의 수준은 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드를 포함하는 rAAV 입자의 CSF 내 투여 후 실질적으로 더 낮다. 또한, CNS의 세포를 형질도입할 수 있는 다른 캡시드를 포함하는 rAAV 입자, 예를 들어, AAV9 및 AAV.rh10에 비해 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드를 포함하는 더 낮은 용량의 rAAV 입자에 의해 높은 수준의 발현이 달성될 수 있다. 따라서, 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 입자는 AAV9 캡시드 또는 AAV.rh10 캡시드를 포함하는 rAAV 입자에 비해 개선된 치료지수를 갖는다.

[0015] 따라서, 일 양상에서, 본 발명은 (1) ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터 및 (2) 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 바이러스 입자를 환자의 뇌척수액(CSF)에 투여하는 단계를 포함하는, MLD의 치료를 필요로 하는 환자의 MLD를 치료하는 방법을 제공하되, 변형된 rAAV 캡시드 단백질은 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 10을 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질은 서열번호 12를 갖는 캡시드 단백질과 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 적어도 95% 적어도 98%, 적어도 98,5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.8%) 동일하다. 일부 실시형태에서, 캡시드 단백질은 서열번호 12를 갖는다.

[0016] 상기 양상의 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복(inverted terminal repeat; ITR) 서열에 측접된 발현 카세트를 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 2개의 AAV ITR에 측접된다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAV.rh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR이다. 일부 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자기-상보성 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 핵산 서열 및 ARSA 폴리펩타이드의 상보체를 암호화하는 제2 핵산 서열을 포함하되, 제1 핵산 서열은 길이의 대부분 또는 전부를 따라서 제2 핵산 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 돌연변이된 AAV ITR에 의해 연결되되, 돌연변이된 AAV ITR은 D 영역의 결실을 포함하고, 말단 분해 서열의 돌연변이를 포함한다.

[0017] 일부 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 rAAV 입자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다.

[0018] 일부 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 rAAV 입자를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 양상에서, 본 발명은 ARSA 폴리펩타이드를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 ARSA 폴리펩타이드를 생성하는 조건하에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포를 배양시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 ARSA 폴리펩타이드를 정제하는 단계를 더 포함한다.

[0019] 일부 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, MLD의 치료를 필요로 하는 개체에서 이를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, MLD의 치료를 필요로 하는 개체에서 이를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, MLD의 치료를 필요로 하는 개체에서 이를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개체는

ARSA 활성을 결여한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, ARSA 활성 증가를 필요로 하는 개체에서 적어도 약 5%만큼 ARSA 활성을 증가시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, ARSA 활성 증가를 필요로 하는 개체에서 적어도 약 10%만큼 ARSA 활성을 증가시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, ARSA 활성 증가를 필요로 하는 개체에서 적어도 약 20%만큼 ARSA 활성을 증가시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, ARSA 활성 증가를 필요로 하는 개체에서 적어도 약 30%만큼 ARSA 활성을 증가시키는 방법을 제공한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, ARSA 활성 증가를 필요로 하는 개체에서 적어도 약 50%만큼 ARSA 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0021] rAAV 입자의 투여는 다양한 경로를 통해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여는 직접 척수 주사 및/또는 뇌내 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 대뇌, 연수, 뇌교, 소뇌, 두개강내, 뇌 주위의 수막, 경질막, 거미막, 연질막, 뇌 주위의 거미막밑 공간의 뇌척수액(CSF), 소뇌의 심부 소뇌핵, 대뇌의 뇌실계, 거미막밑공간, 선조체, 피질, 중격, 시상, 시상하부, 및 뇌의 실질로부터 선택된 부위에서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 투여는 적어도 하나의 뇌 가쪽뇌실로의 뇌실내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 경부, 흉부 및/또는 요부 영역 내의 수막강내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 선조체내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 시상내 주사를 포함한다.

[0022] 상기 양상의 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 척수에 직접 주사를 통해, 척추강내 주사를 통해 및/또는 낭내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 척수 또는 대수조의 하나 초과의 위치에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 척수의 하나 초과의 위치에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 척수의 허리 거미막밑(subarachnoid) 공간, 가슴 거미막밑 공간 및 목 거미막밑 공간 중 하나 이상에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 대수조에 투여된다.

[0023] 상기 양상의 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 이를 필요로 하는 환자에게 1회만 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 (예를 들어, 1개월 또는 1년 이상에 걸쳐) 이를 필요로 하는 환자에게 여러 번 투여된다. 다른 실시형태에서, rAAV 입자는 이를 필요로 하는 환자에게 매년 1회 투여된다. 다른 실시형태에서, rAAV 입자는 이를 필요로 하는 환자에게 1년 2회 투여된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 입자, 조성물 또는 세포 중 어느 하나를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트는 사용 설명서; 완충제 및/또는 약제학적으로 허용 가능한 부형제; 및/또는 보틀, 바이알 및/또는 주사기를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0025] **도 1a 내지 도 1c**는 MLD의 마우스 모델(ARSA$^{-/-}$)에서 독성 설파타이드 침착물(C24-ST)의 더 양호한 제거를 유도하는, 두 상이한 발현 카세트를 포함하는 바이러스 입자에 의한 생체내 증가된 ARSA 발현을 나타낸다. **도 1a**는 바이러스 입자에서 사용되는 발현 카세트, 즉, WPRE 요소를 갖는 발현 카세트 및 WPRE 요소가 없는 발현 카세트를 나타낸다. **도 1b**는 마우스에 대한 바이러스 입자의 양쪽 안구뒤 주사 후 ARSA의 발현 수준을 나타낸다. **도 1c**는 마우스에 대한 바이러스 입자의 양쪽 안구뒤 주사 후 C24-ST 수준을 나타낸다.

도 2는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스가 뇌, 척수 및 간에서 증가된 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다는 것을 보여준다.

도 3은 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스가 투여 3개월 후 뇌 및 척수에서 상당히 감소된 설파타이드 수준을 나타낸다는 것을 도시한다.

도 4는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스의 뇌에서 측정된 개선된 뇌량 수초화(Corpus Callosum myelination)를 나타낸다.

도 5는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스의 뇌에서 관찰된 증가된 수초-형성 및 성숙 희소돌기아교세포의 세포 수를 나타낸다.

도 6a 내지 도 6b는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스의 뇌에서의 ARSA 단백질 교차-교정 정도를 나타낸다. **도 6a**는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE의 투여 후 3개월 후에 매칭된 시상 뇌 반측의 신호 오버레이를 나타낸다. **도 6b**는 교차-교정 인자의 히트맵을 나타낸다.

도 7a 내지 도 7b는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 조기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스가 뇌, 척수, 등쪽 뿌리 신경절(DRG) 및 간에서의 광범위한 CNS 인간 ARSA(hARSA) 발현 및 증가된 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. **도 7a**는 투여 4개월 후에, 인간 ARSA에 대해 IHC에 의해 시상 뇌 절편에서 광범위한 ARSA 발현이 관찰되었다는 것을 나타낸다. **도 7b**는 뇌, 척수, DRG 및 간이 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE로 처리된 동물에서의 ARSA 활성의 유의미한 증가를 나타낸다는 것을 보여준다.

도 8a 내지 도 8d는 초기(6개월) ARSA$^{-/-}$ 마우스에게 투여된 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 후의 뇌(**도 8a**), 간(**도 8b**), 혈장(**도 8c**) 및 CSF(**도 8d**)에서의 설파타이드 수준을 나타낸다. 설파타이드 수준은 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE의 투여 후 뇌, 척수, 간, 혈장 및 CSF에서 유의미하게 증가되었다.

도 9a 내지 도 9c는 AAV.rh10-ARSA-FLAG-WPRE 투여에 의한 처리가 저용량 및 고용량의 바이러스 입자에서 비인간 영장류(NHP)의 뇌 및 척수에서 유의미하게 증가된 설파타제 활성을 초래한다는 것을 나타낸다. **도 9a**는 뇌에서의 설파타제 활성을 나타낸다. **도 9b**는 척수에서의 설파타제 활성을 나타낸다. **도 9c**는 바이러스 입자의 투여 후 대표적인 뇌 단면을 나타낸다.

도 10a 및 **도 10b**는 캡시드 AAV1999가 AAVrh.10에 비해, NHP의 뇌 및 척수에서 더 높은 이식유전자 발현을 나타낸다는 것을 보여준다. **도 10a**는 rAAV 입자의 투여 후 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현 수준을 나타낸다. **도 10b**는 모든 샘플에 걸쳐, AAV1999-처리 NHP의 뇌에서의 GFP 발현이 AAVrh.10-처리 NHP에 비해 93% 내지 123% 더 높았다는 것을 나타낸다.

도 11은 NHP에 대한 AAV1999 또는 AAVrh.10의 투여 후 뇌에서의 GFP 발현의 히트맵을 나타낸다.

도 12는 eGFP에서 항체로 염색된 대표적인 매칭 뇌 절편이 AAV1999 처리 NHP에서 강한 발현을 나타내며, 이는 AAVrh10에 비해 우수한 생체분포를 입증한다는 것을 나타낸다**(도 12)**.

도 13은 AAV1999-GFP를 포함하는 입자의 투여 후 NHP의 척수 및 DRG에서의 GFP 발현을 나타낸다.

도 14는 심장 및 간에서의 AAV1999-GFP 발현이 처리된 NHP에서 AAVrh10-GFP에 비해 더 낮았다는 것을 나타낸다.

도 15a 내지 도 15b는 AAVrh10-GFP 입자 또는 AAV1999-GFP 입자의 투여 후 다양한 조직에서의 AAVrh10 및 AAV1999 벡터 게놈 로드(load)를 나타낸다. **도 15a**는 뇌, 척수 및 DRG에서의 벡터 게놈 로드를 나타낸다. 뇌, 척수 및 DRG에서의 벡터 게놈 로드는 AAVrh10에 대해서보다 AAV1999에 대해 더 낮다. **도 15b**는 AAVrh10-GFP 또는 AAV1999-GFP의 투여 후 간, 심장, 폐, 신장 및 비장에서의 벡터 게놈 로드를 나타낸다.

도 16은 GFP 발현(y-축)과 조직 벡터 게놈(x-축) 사이의 상관관계에서 좌측-이동을 나타내며, AAV1999에 대한 상관관계에서(적색) 좌측 이동되는데, 이는 AAVrh.10에 비해 벡터의 더 높은 단백질 발현 및 더 낮은(대략 10배) 조직 용량을 나타낸다.

도 17은 rAAV 입자 생산을 위한 특정 플라스미드의 벡터 맵을 나타낸다.

도 18은 AAV1999-ARSA로 처리된 *Arsa* KO 마우스가 지속적 hARSA mRNA 발현을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 13개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 뇌 및 척수 샘플을 수집하였다. RTdPCR을 수행하여 마우스 *Hprt* 유전자에 대해 정규화된 h*ARSA* mRNA 발현을 정량화하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. FB = 제형 완충제. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001. WT+FB: 제형 완충제를 투여한 야생형 마우스; KO+FB: 제형 완충제를 투여한 *Arsa* KO 마우스; KO+AAV: AAV1999-ARSA를 투여한 *Arsa* KO 마우스.

도 19는 1AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 시간에 따라 지속적 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 13개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 뇌, 척수, DRG, 좌골 신경, 간 및 혈장 샘플을 수집하였다. ARSA-매개 설파타제 활성을 설파타제 활성 분석을 사용하여 측정하였고; 데이터를 BCA 분석에 의해 측정된 총 단백질에 대해 정규화하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 20은 2AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 뇌 및 척수에서 라이소-설파타이드 수준의 유의미한 개선을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 13개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 뇌, 척수, DRG, 좌골 신경, 간, 혈장 및 CSF 샘플을 수집하였다. LC-MS를 사용하여 설파타이드 수준을 측정하였다. 조직 중량에 대해 정규화된 데이터: ng/㎖(50 ㎕)에서 ㎍/g로 전환시킴. 데이터를 (30 ㎕)ng/㎖에서 ng/㎖(혈장)로, ng/㎖(5 ㎕)에서 ng/㎕(CSF)로 전환시켰다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 21은 AAV1999-ARSA로 처리한 *Arsa* KO 마우스가 중요한 염증 마커의 발현에서 유의미한 개선을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 13개월 후에, Arsa KO 마우스를 안락사시키고, 뇌 및 척수 샘플을 수집하였다. RTdPCR을 수행하여 마우스 *Hprt* 유전자에 대해 정규화된 *Gfap, Aif1*(Iba1에 대한 유전자) 및 *Lamp1* 수준을 정량화하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 22는 AAV1999-hARSA에 의한 *Arsa* KO 마우스의 처리가 혈장 Nf-L 수준을 장기간(투여 후 13개월) 유의미하게 감소시켰다는 것을 나타낸다. 투여 13개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 혈장 샘플을 수집하였다. Quanterix 플랫폼에 의해 Nf-L 수준을 측정하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 23은 *Arsa* KO 마우스가 시간에 따라 청력의 점진적인 악화를 나타내고; AAV1999-ARSA에 의한 처리가 청각 표현형의 진행을 방지한다는 것을 보여준다: 투여 4-, 7-, 10- 및 13개월 후에, 마취된 동물의 두피에 배치한 전극을 통해 ABR 측정을 기록하였다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 분산 분석. 별표는 KO+FB 대 KO+AAV 그룹을 나타낸다. *= KO+FB 대 KO+AAV; *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 24a 내지 도 24c는 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 뇌 및 척수에서 MLD-연관 병리의 상당한 반전을 나타낸다는 것을 보여준다: 투여 13개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 조직병리학 평가를 위해 뇌(**도 24a**), 척수(**도 24b**) 및 DRG(**도 24c**) 샘플을 수집하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 25a 내지 도 25c는 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 시간에 따라 지속적 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 뇌 샘플을 수집하였다(**도 25a**). 디지털 PCR(dPCR)을 수행하여 각 조직에서의 AAV1999-ARSA 벡터 수준을 정량화하고, *Rab1a* 유전자에 대해 정규화하였다. (**도 25b** 및 **도 25c**) ARSA-매개 설파타제 활성을 설파타제 활성 분석 키트(ab204731)를 사용하여 측정하였고; 데이터를 BCA 분석에 의해 측정된 총 단백질에 대해 정규화하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 분산 분석.

도 26a 내지 도 26f는 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 시간에 따라 설파타이드 아이소폼의 점진적 제거를 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 뇌 샘플을 수집하였다. LC-MS를 사용하여 **(도 26a)** 라이소-설파타이드, **(도 26b)** C16-설파타이드 아이소폼 및 **(도 26c)** C18-설파타이드 아이소폼을 측정하였다. 조직 중량에 대해 정규화된 데이터: ng/㎖(50 ㎕)에서 ㎍/g로 전환시킴. (**도 26d 내지 도 26f**) 설파타이드 제거의 점진적 특성을 설명하기 위해, 데이터를 **(도 26d)** 라이소-설파타이드, **(도 26e)** C16-설파타이드 아이소폼 및 **(도 26f)** C18-설파타이드 아이소폼에 대해 KO+FB 동물에 남아있는 평균 ST에 비해, KO+AAV 동물에 남아있는 ST의 백분율로서 제시한다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 27은 *Arsa* KO 마우스의 CSF 및 혈장에서의 총 설파타이드 수준이 AAV1999-ARSA로 처리 시 유의미한 감소를 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, CSF 및 혈장 샘플을 수집하였다. LC-MS를 사용하여 설파타이드 수준을 측정하였다. 데이터를 (30 ㎕) ng/㎖에서 ng/㎖(혈장)로, ng/㎖(5 ㎕)에서 ng/㎕(CSF)로 전환시켰다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA.

도 28은 KO+FB 그룹과 비교하여, AAV1999-ARSA의 투여 후 6개월까지 감소된 혈장 Nf-L 수준의 초기 증가를 나타낸다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 혈장 샘플을 수집하였다. Quanterix 플랫폼에 의해 Nf-L 수준을 측정하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001.

도 29a 내지 도 29d는 뇌 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스에서 발견된 최소 중증도의 현미경 소견을 나타낸다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 조직병리학 분석을 위해 뇌 샘플을 수집하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타내고; 소견은 (**도 29a**) 뇌간 및 소뇌 변성증, (**도 29b**) 공포형성, (**도 29c**) 침윤 및 (**도 29d**) 해마 변성의 발생률 및 중증도 하에 분류되었다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA.

도 30a 내지 도 30e는 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스가 DRG 및 말초 신경에서 최소 내지 경증의 소견을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 1-, 2-, 3- 및 6개월 후에, *Arsa* KO 마우스를 안락사시키고, 조직병리학 분석을 위해 DRG(**도 30a 내지 도 30c**), 척수(**도 30d**) 및 좌골 신경(**도 30e**)을 수집하였다. 각 데이터 포인트는 단일 동물을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA.

도 31은 NHP 뇌에서의 광범위한 용량-의존적 AAV1999-ARSA 벡터 생체분포를 나타낸다. AAV1999-ARSA 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 뇌는 한쪽 반구가 급속 냉동된 채로 반절개되었고; 각 반구로부터 회색질(47개의 펀치) 및 백질(17개의 펀치)을 나타내는 64개의 조직 펀치를 수집하였다. 디지털 PCR(dPCR)을 수행하여 각 조직 펀치에서의 AAV1999 벡터 농도를 정량화하였고, TUBB1 유전자 인트론에 대해 정규화하였다. 각 데이터 포인트는, **(좌)** 해당 그룹에서 모든 NHP에 대해 평균을 내거나, **(우)** 개개 뇌 영역으로 제공한, 해당 조직 펀치에 대한 VG/세포 노출을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. NHP당 용량.

도 32는 NHP에서 19개의 회색질 뇌 영역에 걸친 광범위한 용량-의존적 hARSA mRNA 발현을 나타낸다. 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 뇌는 한쪽 반구가 급속 냉동된 채로 반절개되었고; 각 반구로부터 19개의 회색질 영역을 나타내는 47개의 조직 펀치를 수집하였다. 역전사 디지털 PCR(RTdPCR)을 수행하여 h*ARSA* mRNA 발현을 정량화하였고, 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*) 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제 1(HPRT) 유전자에 대해 정규화하였다. 각 데이터 포인트는 (좌) 해당 그룹에서 모든 NHP에 대해 평균을 내거나, (우) 개개 뇌 영역으로 제공하는, 해당 조직 펀치에서의 정규화된 h*ARSA* 발현을 나타낸다. 좌: 중앙값을 나타내는 산점도; 우: 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타냄; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA.

도 33a 내지 도 33c는 NHP에서 19개의 회색질 뇌 영역에 걸친 광범위한 용량-의존적 hARSA 단백질 발현을 나타낸다. AAV1999-ARSA 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 뇌는 한쪽 반구가 급속 냉동된 채로 반절개되었고; 각 반구로부터 회색질을 나타내는 30개의 조직 펀치를 수집하였다. LC-MS를 수행하여 인간 ARSA 단백질 수준을 정량화하였다. 각 데이터 포인트는 해당 조직 펀치에서의 인간 ARSA의 양, 해당 그룹에서 3마리의 동물에 대한 평균을 나타내며, **(도 33a)** 해당 그룹에서의 모든 NHP에 대한 평균으로 제공되거나, **(도 33b)** 개개 뇌 영역마다 제공되거나, **(도 33c)** 해당 펀치에서 벡터 게놈에 대한 상관관계로서 제공된다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다. 1e10 VG/gm(7.5e11 VG) 및 3.3e10 VG/gm(2.5e12 VG)으로부터의 데이터는 검출하한이었고, 제외하였다. 좌: 중앙값을 나타내는 산점도; 우: 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타냄; 통계학: Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA.

도 34a 내지 도 34b는 척추 문측-미골 축(spinal rostral-caudal axis)을 따라서 균일한 용량-의존적 AAV1999 벡터 생체분포 및 hARSA mRNA 발현을 나타낸다. AAV1999-ARSA 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 인접한 DRG가 있는 8개의 척수 분절(경추, 상부 흉부, 하부 흉부 및 요부에서 각각 2개씩)을 급속 냉동시키고, DNA/RNA를 단리시켰다. **(도 34a)** 디지털 PCR(dPCR)을 수행하여 AAV1999 벡터 농도를 정량화하였고, TUBB1 유전자 인트론에 대해 정규화하였다. **(도 34b)** RTdPCR을 수행하여 내인성 HPRT 유전자에 대해 정규화된 h*ARSA* mRNA 발현을 정량화하였다. 각 데이터 포인트는 해당 그룹의 모든 NHP에 걸쳐 평균을 낸 해당 샘플에 대한 배경 차감 VG/세포 노출 또는 정규화된 h*ARSA* 발현을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 35는 내장 기관 및 말초 신경에 대한 AAV1999-ARSA 벡터 생체분포를 나타낸다. 투여 5주 후에, NHP를 안락사

시켰고, 내장 기관으로부터의 샘플을 수집하였다. 디지털 PCR(dPCR)을 수행하여 각 조직 펀치에서의 AAV1999 벡터 농도를 정량화하였고, TUBB1 유전자 인트론에 대해 정규화하였다. 각 데이터 포인트는, 해당 그룹에서 모든 NHP에 대해 평균을 낸 해당 조직 펀치에 대한 VG/세포 노출을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 36은 1e11 및 3.3e11 VG/gm 뇌 중량 용량에서의 치료적 역치를 충족시킬 가능성이 있는 NHP 뇌에서의 인간 ARSA 단백질 발현을 나타낸다. AAV1999-ARSA 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 뇌는 한쪽 반구가 급속 냉동된 채로 반절개되었고; 각 반구로부터 회색질을 나타내는 30개의 조직 펀치를 수집하였다. LC-MS를 수행하여 인간 및 내인성 마카카 파시쿠랄리스 cyARSA 단백질 수준을 정량화하고, 백분율(huARSA/cyARSA)로 제시하였다. 각 데이터 포인트는 해당 조직 펀치의 hARSA 대 사이노몰거스 cyARSA 단백질의 비로 나타내며, (**좌**) 해당 그룹의 3마리 동물에 대한 평균은 해당 그룹의 모든 NHP에 대한 평균으로 제공되거나, (**우**) 개개 뇌 영역마다 제공된다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 37a 내지 도 37b는 AAV1999-ARSA 유효 용량이 치료적으로 의미있다는 것을 나타낸다. **도 37a**는 7명의 건강한 3 내지 8세 기관-공여자로부터의 12개의 뇌 영역에서 인간 ARSA 단백질 수준을 정량화하기 위해 LC-MS를 수행하였다는 것을 나타낸다. 조직은 NIH 뇌 은행에서 조달되었다. **도 37b**는 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다는 것을 나타낸다. 뇌는 한쪽 반구가 급속 냉동된 채로 반절개되었고; 각 반구로부터 회색질을 나타내는 30개의 조직 펀치를 수집하였다. LC-MS를 수행하여 인간 ARSA 단백질 수준을 정량화하였다. 각 그룹에서의 평균 ARSA 단백질을 제시한다. 후원사는 건강한 기관-공여자의 뇌에서의 인간 ARSA와 관련된 NHP에서의 인간 ARSA의 백분율을 제시한다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 38은 투여 그룹 중 하나에서 AAV1999-ARSA의 투여 후 1주차 또는 5주차(부검)에 NHP에서 관찰된 임상 징후(기능 또는 행동 결함)가 없다는 것을 나타낸다. 투여 전, 투여 7일 후 및 부검 전(투여 후 5주) 35개의 기능 및 행동 매개변수에 대해 NHP를 시험하였다. 소견은 '정상 범위' 또는 '비정상 임상 소견'으로 점수화하였다. 아래의 그래프는 부검 시 소견이다. CRL 수의사가 수행한 수행한 기능 및 행동 평가.

도 39a 내지 도 39c는 AAV1999-ARSA의 CM 내 주사가 잘 용인되어, 예상되는 Nf-L 상승을 초래하였고; AAV1999-ARSA는 선천성 면역 반응도 세포-매개 면역 반응도 촉발하지 않았다는 것을 나타낸다. **도 39a**에 나타낸 바와 같이, 투여 전 및 부검 시, CSF를 수집하였고, Quanterix 플랫폼으로 Nf-L 수준에 대해 분석하였다. 각 데이터 포인트는 해당 그룹에서 모든 NHP에 대해 평균을 낸 해당 샘플의 Nf-L 수준을 나타냈다. **도 39b**에 나타낸 바와 같이, 투여 전 및 투여 후 2일차, -4일차, 7일차, 14일차 및 부검 시 혈장을 단리시켰다. Luminex 검정을 사용하여 IL-1b, IL-1RA, IL-6, IL-10, IL-12/23(p40), IL-15, IL-18, IFN-g, TNF-a, G-CSF, MCP-1, MIP-1b, GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-13 및 IL-17A의 농도를 결정하였다. 각 데이터 포인트는 해당 그룹에서 모든 NHP에 대해 평균을 낸 해당 샘플의 사이토카인 농도를 나타냈다. **도 39c**에 나타낸 바와 같이, 1e11 및 3.3e11VG/gm 뇌 중량 투여 그룹의 동물로부터 단리시킨 PBMC에 IFN-γ ELISpot을 실시하였다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다; 통계학: *Tukey 및 #Dunnett 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA.

도 40은 AAV1999-ARSA 처리 NHP가 4회 용량에 걸쳐 뇌에서의 경증의 현미경 소견을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 샘플을 수집하였다. 조직병리학적 평가를 위해 한쪽 반구가 고정된 상태로 뇌를 반절개하였다. 각 데이터 포인트는 단핵 침윤, 뉴런 또는 신경 섬유 변성 및 교증의 범주에서 측정된 해당 투여 그룹의 모든 동물에 걸쳐 평균을 낸 현미경 소견의 발생률 및 중증도를 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 41A 내지 도 41B는 AAV1999-ARSA 처리 NHP가 NHP의 척수, 요골 및 대퇴 신경에서 중등증의 현미경 소견; 좌골 신경에서 뚜렷한 소견을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 조직병리학적 평가를 위해 샘플을 수집하였다. 각 데이터 포인트는 단핵 침윤, 뉴런 또는 신경 섬유 변성 및 교증의 범주에서 측정된 해당 투여 그룹의 모든 동물에 걸쳐 평균을 낸 현미경 소견의 발생률 및 중증도를 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을 나타낸다.

도 42a 내지 도 42b는 척수 문측-미골 축을 따라서 8개의 분절에 걸쳐 평균을 낼 때 AAV1999-ARSA 처리 NHP가 DRG에서 경증의 소견을 나타낸다는 것을 보여준다. 투여 5주 후에, NHP를 안락사시켰고, 조직병리학적 평가를 위해 샘플을 수집하였다. 좌측 패널에서, 각 데이터 포인트는 해당 투여 그룹의 모든 동물에 걸쳐 8개 척추 분절로부터의 DRG에 걸쳐 평균을 낸 현미경 소견의 평균 발생률 및 중증도를 나타낸다. 우측 패널에서, 각 데이터 포인트는 해당 투여 그룹에서 모든 동물에 걸쳐 평균을 낸, DRG마다의 현미경 소견의 발생률 및 중증도를 나타낸다. 측정된 범주는 (**도 42a**) 변성 및 괴사 및 (**도 42b**) 단핵 침윤이다. 오차 막대는 표준 오차와 함께 평균을

나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 일부 양상에서, 본 발명은 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 발현 카세트, 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터, 및 바이러스 입자, 및 약제학적 조성물을 제공한다. 추가 양상에서, 본 발명은 뇌 영역에서의 설파타이드 제거에 따른, 예를 들어, ARSA 활성 증가, 뇌, 척수, 간, 혈장 및 CSF에서의 설파타이드 축적 감소, 뇌량에서의 수초화 증가 및 정상화, 뇌에서의 희소돌기아교세포 집단 증가, 및 CNS 병리 개선에 의해 이염색성 백질이영양증(MLD)을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 발명은 본 개시내용의 발현 카세트를 사용하여 개체에서 MLD를 치료하기 위한 키트를 제공한다.

[0027] **정의**

[0028] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포에 전달되는 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭한다.

[0029] 용어 "폴리펩타이드"와 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호 호환 가능하게 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 이러한 아미노산 잔기의 중합체는 천연 또는 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있고, 펩타이드, 올리고펩타이드, 아미노산 잔기의 이량체, 삼량체 및 다량체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 전장 단백질 및 이의 단편이 모두 상기 정의에 포함된다. 이 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화 등을 포함한다. 또한, 본 발명의 목적상, "폴리펩타이드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 천연 서열에 대한 결실, 부가, 및 치환(일반적으로는 사실상 보존적)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 변형은 부위-지정 돌연변이유발을 통해서와 같이 의도적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통해서와 같이 우연적일 수 있다.

[0030] "재조합 바이러스 벡터"는 하나 이상의 이종성 서열(즉, 바이러스 유래가 아닌 핵산 서열)을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드 벡터를 지칭한다. 재조합 AAV 벡터의 경우, 재조합 핵산은 적어도 하나의, 실시형태에 따라 2개의 역위 말단 반복 서열(ITR)에 의해 측접되어 있다.

[0031] "재조합 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 적어도 하나의, 일부 실시형태에 따라 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)에 의해 측접된 하나 이상의 이종성 서열(즉, AAV 유래가 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 벡터를 지칭한다. 이러한 rAAV 벡터는 적절한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적절한 헬퍼 기능을 발현하고), AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현시키는 숙주 세포에 존재할 때 복제될 수 있고, 감염성 바이러스 입자로 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 염색체, 또는 클로닝이나 형질감염에 사용되는 플라스미드와 같은 다른 벡터)에 통합될 때, 이러한 rAAV 벡터는 AAV 패키징 기능 및 적절한 헬퍼 기능의 존재하에서 복제 및 캡시드화에 의해 "회수"될 수 있는 "프로-벡터(pro-vector)"로 지칭될 수 있다. rAAV 벡터는 비제한적으로 지질과 복합체화되고, 리포좀 내에 캡슐화되고, 바이러스 입자, 특히 AAV 입자에 캡시드화된 선형 인공 염색체, 플라스미드를 포함하는 다수의 형태 중 임의의 형태일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 바이러스 캡시드에 패키징되어 "재조합 아데노-관련 바이러스 입자(rAAV 입자)"를 생성할 수 있다.

[0032] "이종성"은 비교 대상이 되거나 내부에 도입 또는 통합되는 개체의 나머지와는 유전자형으로 구분되는 개체로부터 유래된 것을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 다양한 세포 유형에 도입된 폴리뉴클레오타이드는 이종성 폴리뉴클레오타이드이다(발현되는 경우, 이종성 폴리펩타이드를 암호화할 수 있음). 마찬가지로, 바이러스 벡터에 혼입되는 세포 서열(예를 들어, 유전자 또는 이의 부분)은 벡터에 대해 이종성 뉴클레오타이드 서열이다.

[0033] 용어 "이식유전자"는 세포에 도입되어 RNA로 전사될 수 있고, 필요에 따라, 적절한 조건에서 번역 및/또는 발현될 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 양상에서, 이는 도입된 세포에 요구되는 특성을 제공하거나, 요망되는 치료적 또는 진단적 결과를 유도한다.

[0034] "닭 β-액틴(CBA) 프로모터"는 닭 β-액틴 유전자(예를 들어, GenBank Entrez Gene ID 396526으로 표시되는 갈러스(*Gallus*) 베타 액틴)로부터 유래된 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "닭 β-액틴 프로모터"는 거대세포바이러스(CMV) 초기 인핸서 요소, 닭 β-액틴 유전자의 프로모터 및 제1 엑손과 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체를 함유하는 프로모터, 예컨대 문헌[Miyazaki, J. *et al.* (1989) *Gene* 79(2):269-77]에 기재된 서열을 지칭할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "CAG 프

로모터"는 상호 호환 가능하게 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "CMV 초기 인핸서/닭 베타 액틴(CAG) 프로모터"는 상호 호환 가능하게 사용될 수 있다.

[0035] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "게놈 입자(gp)", "게놈 당량", 또는 "게놈 복제물"은 감염성 또는 기능성과 무관하게, 재조합 AAV DNA 게놈을 포함하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 제제에서 게놈의 수는 본 명세서의 실시예에, 또는 예를 들어, 문헌[Clark *et al*. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al*. (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278]에 기재된 것과 같은 절차에 의해 측정될 수 있다.

[0036] 본 명세서에 사용된 용어 "벡터 게놈(vg)"은 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 한 세트의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있다. 벡터 게놈은 바이러스 입자에 캡시드화될 수 있다. 특정 바이러스 벡터에 따라, 벡터 게놈은 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA, 또는 단일가닥 RNA, 또는 이중가닥 RNA를 포함할 수 있다. 벡터 게놈은 특정 바이러스 벡터와 관련된 내인성 서열 및/또는 재조합 기술을 통해 특정 바이러스 벡터에 삽입되는 임의의 이종성 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터 게놈은 프로모터를 측접하는 적어도 하나의 ITR 서열, 스터퍼, 관심 서열(예컨대, RNAi), 및 폴리아데닐화 서열을 포함할 수 있다. 완전한 벡터 게놈은 벡터의 폴리뉴클레오타이드 서열의 완전한 세트를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터의 핵산 역가는 vg/㎖ 단위로 측정될 수 있다. 이러한 역가를 측정하는 데 적합한 방법은 당업계에 알려져 있다(예컨대, 정량적 PCR).

[0037] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "감염 단위(iu)", "감염성 입자", 또는 "복제 단위"는 예를 들어, 문헌[McLaughlin *et al*. (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973]에 기술된 바와 같이, 복제 중심 검정으로도 알려져 있는, 감염 중심 검정에 의해 측정된, 감염성 및 복제 능력이 있는 재조합 AAV 벡터 입자들의 수를 지칭한다.

[0038] 바이러스 역가와 관련하여 사용된 용어 "형질도입 단위(tu)"는 본 명세서의 실시예, 또는 예를 들어 문헌[Xiao *et al*. (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; 또는 Fisher *et al*. (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (LFU 검정)]에 기재된 것과 같은 기능성 검정으로 측정되는 기능성 이식유전자 산물의 생성을 초래하는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0039] "역위 말단 반복" 또는 "ITR" 서열은 당업계에서 널리 이해되는 용어로, 반대 방향의 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다.

[0040] 당업계에서 널리 이해되는 용어인 "AAV 역위 말단 반복(ITR)" 서열은 고유한 단일가닥의 AAV 게놈의 양 말단에 존재하는 대략 145-뉴클레오타이드 서열이다. ITR의 가장 바깥쪽 125개 뉴클레오타이드는 두 가지 대안적인 방향 중 하나로 존재할 수 있어, 상이한 AAV 게놈들 사이에, 그리고 단일 AAV 게놈의 양 말단 사이에 이질성을 초래한다. 가장 바깥쪽의 125개의 뉴클레오타이드는 또한 자기-상보성의 여러 짧은 영역(A, A', B, B', C, C' 및 D 영역으로 명명됨)을 포함하며, 이는 가닥내 염기쌍 형성이 ITR의 상기 부분 내에서 발생하는 것을 가능케 한다.

[0041] "말단 분해 서열" 또는 "trs"는 바이러스 DNA 복제 중에 AAV rep 단백질에 의해 절단되는 AAV ITR의 D 영역 내의 서열이다. 돌연변이 말단 분해 서열은 AAV rep 단백질에 의한 절단에 불응한다.

[0042] "AAV 헬퍼 기능"은 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 기능을 지칭한다. AAV 헬퍼 기능은 비제한적으로 AAV 복제 및 패키징을 보조하는 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 유전자를 포함하는 임의의 여러 형태로 제공될 수 있다. 유전자독성제와 같은 다른 AAV 헬퍼 기능은 당업계에 알려져 있다.

[0043] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 (결함이 있는 파보바이러스인) AAV가 숙주 세포에 의해 복제되어 패키징될 수 있게 하는 바이러스를 지칭한다. 헬퍼 바이러스는 AAV의 복제를 가능하게 하는 "헬퍼 기능"을 제공한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예를 들어, 백시니아 및 배큘로바이러스를 비롯한 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 많은 상이한 서브그룹을 포함하지만, 서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 가장 흔히 사용된다. 인간, 비인간 포유류, 및 조류 기원의 여러 아데노바이러스가 알려져 있으며, ATCC와 같은 기탁기관으로부터 입수 가능하다. ATCC와 같은 기탁기관으로부터 또한 입수 가능한 헤르페스 패밀리의 바이러스는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 엡스타인 바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 및 가성 광견병 바이러스(PRV)를 포함한다. AAV의 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능의 예는 E1A 기능, E1B 기능, E2A 기능, VA 기능, 및 E4orf6 기능을 포함한다. 기탁기관으로부터 입수 가능한 배큘로바이러스는 아우토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) 핵 다면체형성 바이러스를 포함한다.

[0044] rAAV의 제제는 감염성 AAV 입자 대 감염성 헬퍼 바이러스 입자의 비가 적어도 약 10^2:1; 적어도 약 10^4:1, 적어

도 약 10^6:1; 또는 적어도 약 10^8:1 이상인 경우, 헬퍼 바이러스가 "실질적으로 없는" 것으로 언급된다. 일부 실시형태에서, 조제물은 등가량의 헬퍼 바이러스 단백질(즉, 상기 언급된 헬퍼 바이러스 입자 불순물이 손상된 형태로 존재하는 경우 그러한 수준의 헬퍼 바이러스의 결과로서 존재할 단백질)이 또한 없다. 바이러스 및/또는 세포 단백질 오염은 일반적으로 SDS 겔 상의 쿠마시 염색 밴드의 존재(예컨대, AAV 캡시드 단백질 VP1, VP2, 및 VP3에 상응하는 밴드가 아닌 밴드의 출현)로서 관찰될 수 있다.

[0045] "유효량"은 임상 결과(예를 들어, 증상의 개선, 임상 평가변수의 달성 등)를 포함하여 유익하거나 요망되는 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다. 질환 상태의 측면에서, 유효량은 질환을 개선하거나, 안정화시키거나, 진행을 지연시키기에 충분한 양이다.

[0046] "개체" 또는 "대상체"는 포유류이다. 포유류는 가축(예컨대, 소, 양, 고양이, 개, 및 말), 영장류(예컨대, 인간 및 원숭이와 같은 비인간 영장류), 토끼, 및 설치류(예컨대, 마우스 및 래트)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 "치료"는 유익하거나 요망되는 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적상, 유익하거나 요망되는 임상 결과는 검출 가능하든 검출 불가능하든 증상의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(예컨대, 악화되지 않은) 상태, 질환의 확산(예컨대, 전이) 방지, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 관해(부분적이든 전체적이든)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존에 비해 연장되는 생존을 의미할 수 있다.

[0048] 본 명세서에 사용된 용어 "예방적 치료"는 개체가 장애를 갖거나 장애를 가질 위험이 있는 것으로 알려지거나 의심되지만 장애의 증상을 나타내지 않거나 최소 증상을 나타낸 치료를 의미한다. 예방적 치료를 받는 개체는 증상의 발생 전에 치료될 수 있다.

[0049] 본 명세서에서 "약"이 붙은 값 또는 매개변수에 대한 언급은 그 값 또는 매개변수 자체에 관한 실시형태를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "약 X"에 대한 설명은 "X"의 설명을 포함한다.

[0050] 본 명세서에 사용된 단수형은 달리 표시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0051] 본 명세서에 기재된 본 발명의 양상 및 실시형태는 양상 및 실시형태를 "포함하는", 양상 및 실시형태로 "이루어진", 및/또는 양상 및 실시형태로 "본질적으로 이루어진" 것을 포함하는 것으로 이해된다.

[0052] **발현 카세트**

[0053] 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자는 코돈-최적화된다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자는 진핵세포와 같은 특정 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다. 진핵세포는 인간, 마우스, 래트, 토끼, 개, 또는 비인간 영장류를 비제한적으로 포함하는 포유류와 같은 특정 유기체의 세포이거나 이러한 유기체로부터 유래된 세포일 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는 천연 아미노산 서열을 유지하면서 천연 서열의 적어도 하나의 코돈을, 관심 숙주 세포의 유전자에서 보다 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써 관심 숙주 세포에서의 발현을 향상시키기 위해 핵산 서열을 변형시키는 과정을 지칭한다. 다양한 종이 특정 아미노산의 소정 코돈에 대해 특정 편향을 나타낸다. 코돈 사용표는 예를 들어 "코돈 사용 데이터베이스"에서 용이하게 입수할 수 있으며, 이들 표는 여러 가지 방식으로 조정될 수 있다(예를 들어, 문헌[Nakamura, Y. *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:292] 참조). 특정 숙주 세포에서의 발현을 위해 특정 서열을 코돈 최적화하기 위한 컴퓨터 알고리즘, 예컨대 Gene Forge(Aptagen; Jacobus, Pa.), DNA2.0, GeneArt(GA) 또는 Genscript(GS), 및 CpG 함량의 감소와 결합된 GS 알고리즘도 이용 가능하다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자는 GA 알고리즘을 사용하여 코돈 최적화된다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자는 서열번호 1의 서열을 갖는다.

[0054] 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 인트론을 추가로 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 다양한 인트론은 당업자에게 알려져 있고, MVM 인트론, F IX 절단 인트론 1, β-글로빈 SD/면역글로빈 중쇄 SA, 아데노바이러스 SD/면역글로빈 SA, SV40 후기 SD/SA(19S/16S), 및 혼성 아데노바이러스 SD/IgG SA를 포함한다. 문헌[Wu *et al.* 2008, Kurachi *et al.*, 1995, Choi *et al.* 2014, Wong *et al.*, 1985, Yew *et al.* 1997, Huang and Gorman (1990)]. 일부 실시형태에서, 인트론은 닭 β-액틴(CBA)/토끼 β-글로빈 혼성 인트론이다. 일부 실시형태에서, 인트론은 잘못된 번역 개시 부위를 최소화하기 위해 모든 ATG 부위가 제거된 닭 β-액틴(CBA)/토끼 β-글로빈 혼성 프로모터 및 인트론이다. 일부 실시형태에서, 인트론은 MVM 인트론, F IX 절단 인트론 1, β-글로빈 SD/면역글로빈 중쇄 SA, 아데노바이러스 SD/면역글로빈 SA, SV40 후기 SD/SA(19S/16S), 또는 혼성 아데노바이러스

SD/IgG SA이다. 일부 실시형태에서, 인트론은 닭 β-액틴(CBA)/토끼 β-글로빈 혼성 인트론이다.

[0055] 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 폴리아데닐화 신호를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화 신호는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호, SV40 폴리아데닐화 신호, 또는 HSV TK pA이다. 일부 실시형태에서, 폴리아데닐화 신호는 문헌[Levitt, N *et al*. (1989), *Genes Develop*. 3:1019-1025]에 기재된 바와 같은 합성 폴리아데닐화 신호이다.

[0056] 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 스터퍼(stuffer) 핵산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 리포터 폴리펩타이드를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 스터퍼 핵산은 핵산 내의 다양한 영역에 위치할 수 있고, 핵산 내의 연속 서열(예를 들어, 단일 위치에서의 단일 스터퍼 핵산) 또는 여러 서열(예를 들어, 하나 초과의 위치(예컨대, 2개의 위치, 3개의 위치 등)에서의 하나 초과의 스터퍼 핵산)로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자의 하류에 위치할 수 있다. 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 이식유전자의 상류(예를 들어, 프로모터와 이식유전자 사이)에 위치될 수 있다. 당업자에 의해 또한 이해되는 바와 같이, 다양한 핵산이 스터퍼 핵산으로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 인간 알파-1-항트립신(AAT) 스터퍼 서열 또는 C16 P1 염색체 16 P1 클론(인간 C16) 스터퍼 서열의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 서열은 유전자의 전부 또는 일부를 포함한다. 예를 들어, 스터퍼 서열은 인간 AAT 서열의 일부를 포함한다. 당업자는 유전자(예컨대, 인간 AAT 서열)의 상이한 부분이 스터퍼 단편으로 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 스터퍼 단편은 유전자의 5' 말단, 유전자의 3' 말단, 유전자의 중간, 유전자의 비암호화 부분(예컨대, 인트론), 유전자의 암호화 영역(예컨대, 엑손), 또는 유전자의 비암호화 및 암호화 부분의 혼합물로부터 유래될 수 있다. 또한, 당업자는 스터퍼 서열의 전부 또는 일부가 스터퍼 서열로 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 서열은 내부 ATG 코돈을 제거하도록 변형된다.

[0057] 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 벡터에 통합된다. 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 바이러스 벡터에 통합된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV 벡터이다.

[0058] **벡터 및 바이러스 입자**

[0059] 특정 양상에서, ARSA 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 인간 ARSA 폴리펩타이드)를 발현시키기 위한 발현 카세트는 벡터에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 바이러스 입자, 예를 들어 하기의 바이러스 입자에 패키징하기 위해 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 도입하기 위한 재조합 바이러스 게놈의 사용을 고려한다. 재조합 바이러스 게놈은 ARSA 폴리펩타이드의 발현을 확립하기 위한 임의의 요소, 예를 들어 프로모터, ITR, 리보솜 결합 요소, 종결인자, 인핸서, 선별 마커, 인트론, 폴리A 신호, 및/또는 복제 기점을 포함할 수 있다. 예시적인 바이러스 게놈 요소 및 바이러스 입자 전달 방법은 아래에 더 상세히 설명되어 있다.

[0060] *비바이러스 전달 시스템*

[0061] 핵산을 세포 또는 표적 조직에 도입하기 위해 종래의 비바이러스 유전자 전달 방법이 사용될 수도 있다. 비바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, 조작되지 않은 핵산, 및 전달 시스템에 복합된 핵산을 포함한다. 예를 들어, 벡터는 지질(예컨대, 양이온성 또는 중성 지질), 리포솜, 다가양이온, 나노입자, 또는 핵산의 세포내 흡수 향상제와 복합체를 형성할 수 있다. 벡터는 본 명세서에 기재된 임의의 전달 방법에 적합한 제제와 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 하나 이상의 바이러스 ITR(예컨대, AAV ITR)을 포함한다.

[0062] *바이러스 입자*

[0063] 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 인간 ARSA 폴리펩타이드)를 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함하는 벡터는 재조합 바이러스 벡터이다. 재조합 바이러스 벡터의 일부 예는 AAV, 렌티바이러스 및 아데노바이러스를 포함한다. 일 양상에서, 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터이다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드(예를 들어, 야생형 인간 ARSA 폴리펩타이드)를 발현시키기 위한 발현 카세트는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열에 측접된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 1개 또는 2개의 ITR에 측접된 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함하는 재조합 AAV 입자이다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트는 2개의 AAV ITR에 측접되어 있다.

[0064] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트는 전사 방향으로 작동 가능하게 연결된 성분, 전사 개시 서열 및 종결 서열을 포함하는 조절 서열에 의해 발현 카세트를 형성한다. 발현 카세트는 5' 및 3' 말단에서 적어도 하나의 기능적 AAV ITR 서열에 의해 측접된다. "기능적 AAV ITR 서열"은 ITR 서열이 AAV 비리온의 회수, 복제, 및 패키징을 위해 의도된 바와 같이 기능함을 의미한다. 전문이 본 명세

서에 참조로 포함되는 문헌[Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97(7)3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):7034-40; 및 Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16:10-16] 참조. 본 발명의 일부 양상을 실시하기 위해, 재조합 벡터는 rAAV에 의한 감염을 위한 물리적 구조 및 캡시드화에 필수적인 AAV의 적어도 모든 서열을 포함한다. 본 발명의 벡터에서 사용하기 위한 AAV ITR은 야생형 뉴클레오타이드 서열을 가질 필요가 없고(예를 들어, 문헌[Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5:793-801]에 기재된 바와 같음), 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있거나, AAV ITR은 여러 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 현재 40개가 넘는 AAV 혈청형이 알려져 있고, 새로운 혈청형 및 기존 혈청형의 변종이 계속 확인되고 있다. 문헌[Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99(18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100(10):6081-6; 및 Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77(12):6799-810] 참조.

[0065] 임의의 AAV 혈청형의 사용은 본 발명의 범주 내인 것으로 간주된다. 일부 실시형태에서, rAAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAV.rh10, AAV11, AAV12, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV ITR 등인 AAV ITR을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 AAV 혈청형으로부터 유래된 벡터이다. 일부 실시형태에서, AAV에서 핵산은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 등의 AAV ITR의 ITR을 포함한다. 특정 실시형태에서, AAV ITR은 AAV2 ITR이다.

[0066] 일부 실시형태에서, 벡터는 스터퍼 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스터퍼 핵산은 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트에 대해 3'에 위치할 수 있다.

[0067] 일부 양상에서, 본 발명은 재조합 자기-상보성 게놈을 포함하는 바이러스 입자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 자기-상보성 벡터이다. 자기-상보성 게놈을 갖는 AAV 바이러스 입자 및 자기-상보성 AAV 게놈의 사용 방법은 미국 특허 제6,596,535호; 제7,125,717호; 제7,765,583호; 제7,785,888호; 제7,790,154호; 제7,846,729호; 제8,093,054호; 및 제8,361,457호; 및 문헌[Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10:2105-2111]에 기재되어 있으며, 이들 각각의 전문은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 자가-상보성 유전체를 포함하는 rAAV는 이의 부분적 상보성 서열(예를 들어, 이식유전자의 상보성 암호화 및 비암호화 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속히 형성할 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 AAV 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공하며, 여기서 rAAV 게놈은 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열(예컨대, 본 발명의 ARSA 폴리펩타이드의 암호화 가닥) 및 제2 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열(예컨대, 본 발명의 ARSA 폴리펩타이드의 비암호화 또는 안티센스 가닥)을 포함하고, 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열은 길이의 대부분 또는 전부를 따라 제2 폴리뉴클레오타이드 서열과 가닥내 염기쌍을 형성할 수 있다.

[0068] 일부 실시형태에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열 및 제2 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열은 사슬내 염기쌍 형성을 촉진하는 서열, 예를 들어, 헤어핀 DNA 구조에 의해 연결된다. 예를 들어, siRNA 분자에서, 헤어핀 구조는 당업계에 알려져 있다. 일부 실시형태에서, 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열과 제2 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열은 돌연변이 ITR(예컨대, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 돌연변이 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 게놈의 복제시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 못할 것이고, 따라서, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 게놈이 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열, 돌연변이 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드에 대해 역방향의 제2 이종성 폴리뉴클레오타이드, 및 제3 AAV ITR.

[0069] 일부 실시형태에서, 제1 이종성 핵산 서열과 제2 이종성 핵산 서열은 돌연변이 ITR(예컨대, 우측 ITR)에 의해 연결된다. 일부 실시형태에서, ITR은 폴리뉴클레오타이드 서열 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG - 3' (서열번호 15)을 포함한다. 돌연변이 ITR은 말단 분해 서열을 포함하는 D 영역의 결실을 포함한다. 결과적으로, AAV 바이러스 게놈의 복제시, rep 단백질은 돌연변이 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 못할 것이고, 따라서, 5'에서 3'의 순서로 다음을 포함하는 재조합 바이러스 게놈이 바이러스 캡시드에 패키징될 것이다: AAV ITR, 조절 서열을 포함하는 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드 서열, 돌연변이 AAV ITR, 제1 이종성 폴리뉴클레오타이드에 대해 역방향의 제2 이종성 폴리뉴클레오타이드, 및 제3 AAV ITR.

[0070] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 입자 내에 캡시드화된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 재조합 AAV 벡터를 포함하는 재조합 AAV 바이러스 입자이다. 특정 표적 세포의 형질도입을 최적화하거나 특정 표적 조직(예를 들어, 뇌 또는 척수) 내의 특이적 세포 유형을 표적으로 하기 위해 상이한 AAV 혈청형이 사용된다. rAAV 입

자는 동일 혈청형 또는 혼합 혈청형의 바이러스 단백질 및 바이러스 핵산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 변형된 AAV1999 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV2 ITR을 포함할 수 있거나, 변형된 AAV1999 캡시드 단백질 및 적어도 하나의 AAV1 ITR을 포함할 수 있다. rAAV 입자의 생성을 위한 AAV 혈청형의 임의의 조합은 각 조합이 본 명세서에 명시적으로 언급된 것처럼 본 명세서에 제공된다.

[0071] AAV의 캡시드(예컨대, AAV9, AAV1999 등)는 3개의 캡시드 단백질, 즉 VP1, VP2, 및 VP3을 포함하는 것으로 알려져 있다. 이러한 단백질은 상당한 양의 중첩 아미노산 서열 및 고유의 N-말단 서열을 포함한다. AAV9 캡시드는 정이십면체 대칭에 의해 배열된 60개의 서브유닛을 포함한다. AAV9는 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질를 약 5:5:50의 비로 포함한다. AAV9의 VP 단백질은 *cap*으로 표기되는 게놈의 구조 단백질-암호화 오픈 리딩 프레임의 산물, 즉, 부수적 캡시드 단백질인 VP1(대략 82 kDa) 및 VP2(대략 73 kDa), 및 주요 캡시드 단백질인 VP3(대략 61 kDa)이다. 대안의 스플라이싱과 누출 스캐닝의 이용으로 인해, 발현될 때, 개개 VP는 전체 VP3을 포괄하는 C 말단을 공유하는 한편, VP1 및 VP2는 N-말단의 VP3 연장이다. VP1 및 VP2는 VP1 고유 영역(VP1u)으로 표기되는 VP1에서 추가 대략 137개의 아미노산에 의해 연장된 대략 73개의 아미노산 아미노산의 영역을 공유한다. 문헌 [Penzes et al., (2021), Journal of Virology 95(19)e0084321]을 참조한다. 본 명세서에 개시된 변형된 AAV9 캡시드 단백질의 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(예를 들어, 서열번호 10)는 VP1에 혼입된다. 본 명세서에 개시된 변형된 AAV9 캡시드 단백질의 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(예를 들어, 서열번호 10)는 VP2에 혼입된다. 본 명세서에 개시된 변형된 AAV9 캡시드 단백질의 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(예를 들어, 서열번호 10)는 VP3에 혼입된다. 본 명세서에 개시된 변형된 AAV9 캡시드 단백질의 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드(예를 들어, 서열번호 10)는 VP1, VP2 및 VP3에 혼입된다.

[0072] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 rAAV 입자를 뇌에 표적화하는 표적화 펩타이드를 포함하는 변형된 AAV9 캡시드 단백질을 포함하는 ARSA 폴리펩타이드의 CSF 내 투여를 위한 rAAV 입자를 제공한다. 추가 실시형태에서, 변형된 AAV9 캡시드의 표적화 펩타이드는 AAV9 구조 단백질의 잔기 588 뒤에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드는 서열번호 10을 갖는다. 일부 실시형태에서, 표적화 펩타이드는 표적화 펩타이드의 N-말단 및 C-말단 단부 상에서 링커 서열에 측접된다. 일부 실시형태에서, N-말단 측면 상의 링커 서열은 서열 AAA를 갖는다. 일부 실시형태에서, C-말단 측면 상의 링커 서열은 AS이다. 일부 실시형태에서, AAV9 캡시드 구조 단백질의 잔기 588 다음에 삽입된 전체 서열은 서열번호 11을 갖는다.

[0073] 일부 실시형태에서, 전체 변형된 AAV9 캡시드 구조 단백질(VP1)은 서열번호 12의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 전체 변형된 AAV9 캡시드 구조 단백질(VP1)은 서열번호 12와 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.8%) 동일하되, 변형된 AAV9 구조적 캡시드는 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함한다.

[0074] 일부 실시형태에서, AAV9 캡시드의 변형된 VP2 캡시드는 서열번호 13의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, AAV9의 변형된 VP2 캡시드는 서열번호 13과 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.8%) 동일한 서열을 갖되, 변형된 AAV9 구조적 캡시드는 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함한다.

[0075] 일부 실시형태에서, AAV9 캡시드의 변형된 VP3 캡시드는 서열번호 14의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, AAV9의 변형된 VP3 캡시드는 서열번호 14와 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 98.5%, 적어도 99%, 적어도 99.2%, 적어도 99.5% 또는 적어도 99.8%) 동일한 서열을 갖되, 변형된 AAV9 구조적 캡시드는 서열번호 10의 표적화 펩타이드를 포함한다.

[0076] *AAV 입자의 생성*

[0077] 형질감염, 안정적인 세포주 생성, 및 아데노바이러스-AAV 혼성체, 헤르페스바이러스-AAV 혼성체(Conway, JE *et al.*, (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) 및 배큘로바이러스-AAV 혼성체(Urabe, M. *et al.*, (2002) *인간 Gene Therapy* 13(16):1935-1943; Kotin, R. (2011) *Hum Mol Genet.* 20(R1): R2-R6)를 포함하는 감염성 혼성 바이러스 생성 시스템을 비롯해, rAAV 벡터 생성을 위한 다수의 방법이 당업계에 알려져 있다. rAAV 바이러스 입자 생성을 위한 rAAV 생성 배양은 1) 적합한 숙주 세포, 2) 적합한 헬퍼 바이러스 기능, 3) AAV rep 및 cap 유전자 및 유전자 산물, 4) 적어도 하나의 AAV ITR 서열(예를 들어, ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 AAV 게놈)에 의해 측접된 핵산(예컨대, 치료 핵산), 및 5) rAAV 생성을 유지시키기에 적합한 배지 및 배지 성분을 모두 필요로 한다. 일부 실시형태에서, 적합한 숙주 세포는 영장류 숙주 세포이다. 일부 실시형태에서, 적합한 숙주 세포는 인간 유래 세포주, 예컨대, HeLa, A549, 293, 또는 Perc.6 세포이다. 일부 실시형태에서, 적합한 헬퍼 바이러스 기능은 야생형 또는 돌연변이 아데노바이러스(예컨대, 감온성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스(HSV),

배큘로바이러스, 또는 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 작제물에 의해 제공된다. 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자 산물은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다. 절대적이진 않지만, 일반적으로 AAV rep 유전자 산물은 rep 유전자 산물이 rAAV 게놈의 복제 및 패키징 기능을 할 수 있는 한, rAAV 벡터 게놈의 ITR과 동일한 혈청형을 갖는다. 당업계에 알려진 적합한 배지를 rAAV 벡터의 생성에 사용할 수 있다. 이러한 배지는 변형된 이글 배지(Modified Eagle Medium; MEM), 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM), 미국 특허 6,566,118호에 기재된 것과 같은 주문제조형 제제, 및 미국 특허 6,723,551호에 기재된 것과 같은 Sf-900 II SFM 배지를 비롯해, Hyclone Laboratories 및 JRH에서 제조된 배지를 제한없이 포함한다(각각의 특허는, 특히 재조합 AAV 벡터의 생성에 사용하기 위한 주문제조형 배지 제제와 관련하여, 전문이 본 명세서에 참조로 포함됨). 일부 실시형태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 실시형태에서, AAV 헬퍼 기능은 배큘로바이러스에 의해 제공되며, 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*; Sf9) 세포)이다.

[0078] rAAV 입자를 생성하는 한 가지 방법은 삼중 형질감염 방법이다. 간략히 말하면, 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께, rep 유전자 및 캡시드 유전자를 포함하는 플라스미드가 (예를 들어, 인산칼슘 방법을 사용하여) 세포주(예를 들어, HEK-293 세포)에 형질감염될 수 있고, 바이러스가 수집되고 필요에 따라 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 rAAV 벡터를 암호화하는 핵산, AAV rep 및 cap을 암호화하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 암호화하는 핵산을 숙주 세포에 삼중 형질감염시켜 생성되었으며, 핵산을 숙주 세포에 형질감염시키면 rAAV 입자를 생성할 수 있는 숙주 세포가 생성된다.

[0079] 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 생산자 세포주(producer cell line) 방법에 의해 생성될 수 있다(문헌[Martin *et al.*, (2013) *인간 Gene Therapy Methods* 24:253-269]; 미국 등록전 공개 US2004/0224411호; 및 문헌[Liu, X.L. *et al.* (1999) *Gene Ther.* 6:293-299] 참조). 간략하게, 세포주(예를 들어, HeLa, 293, A549, 또는 Perc.6 세포주)는 rep 유전자, 캡시드 유전자, 및 프로모터-이종성 핵산 서열(예를 들어, ARSA 폴리펩타이드)을 포함하는 벡터 게놈을 함유하는 플라스미드로 안정적으로 형질감염될 수 있다. 세포주는 rAAV 생성을 위한 선도 클론을 선택하기 위해 선별될 수 있고, 이어서 생산 생물반응기로 확장되고 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 또는 HSV)로 감염되어 rAAV 생성을 개시할 수 있다. 후속적으로, 바이러스가 채취될 수 있고, 아데노바이러스가 (예를 들어, 가열에 의해) 비활성화되고/되거나 제거될 수 있고, rAAV 입자가 정제될 수 있다. 이와 같이, 일부 실시형태에서, rAAV 벡터를 암호화하는 핵산, AAV rep 및 cap을 암호화하는 핵산, 및 AAV 헬퍼 바이러스 기능을 암호화하는 핵산 중 하나 이상을 포함하는 생산자 세포주에 의해 rAAV 입자를 생성하였다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 생산자 세포주 방법은 삼중 형질감염 방법에 비해 거대 게놈을 갖는 rAAV 입자를 생성하는 데 유리할 수 있다.

[0080] 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자를 암호화하는 핵산 및/또는 rAAV 게놈은 생산자 세포주에서 안정적으로 유지된다. 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자를 암호화하는 핵산 및/또는 rAAV 게놈은 하나 이상의 플라스미드 상에서 세포주에 도입되어 생산자 세포주를 생성한다. 일부 실시형태에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 게놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 다른 실시형태에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 게놈은 상이한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 플라스미드를 사용하여 안정적으로 형질감염된 세포주는 세포주의 다회 계대(예를 들어, 세포의 5, 10, 20, 30, 40, 50회, 또는 50회 초과 계대)를 위해 플라스미드를 유지한다. 예를 들어, 플라스미드(들)는 세포가 복제됨에 따라 복제될 수 있거나, 플라스미드(들)는 세포 게놈에 통합될 수 있다. 플라스미드가 세포(예를 들어, 인간 세포)에서 독자적으로 복제할 수 있도록 하는 다양한 서열이 확인된 바 있다(예를 들어, 문헌[Krysan, P.J. *et al.* (1989) *Mol. Cell Biol.* 9:1026-1033] 참조). 일부 실시형태에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커(예컨대, 항생제 내성 마커)를 포함할 수 있다. 포유류 세포에서 일반적으로 사용되는 선택 마커는 블라스티시딘, G418, 하이그로마이신 B, 제오신, 퓨로마이신, 및 이들의 유도체를 제한없이 포함한다. 세포에 핵산을 도입하는 방법은 당업계에 알려져 있으며, 바이러스 형질도입, 양이온성 형질감염(예를 들어, DEAE-덱스트란과 같은 양이온성 중합체, 또는 리포펙타민과 같은 양이온성 지질을 사용), 인산칼슘 형질감염, 미량주사, 입자 폭격, 전기천공, 및 나노입자 형질감염을 제한없이 포함한다(더 자세한 내용은, 예를 들어 문헌[Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010)*Anal. Bioanal. Chem.* 397:3173-3178] 참조).

[0081] 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자를 암호화하는 핵산 및/또는 rAAV 게놈은 생산자 세포주의 게놈에 안정적으로 통합된다. 일부 실시형태에서, AAV rep 및 cap 유전자를 암호화하는 핵산 및/또는 rAAV 게놈은 하나 이상의 플라스미드 상에서 세포주에 도입되어 생산자 세포주를 생성한다. 일부 실시형태에서, AAV rep, AAV cap, 및 rAAV 게놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 다른 실시형태에서, AAV rep, AAV cap, 및

rAAV 게놈은 상이한 플라스미드 상에서 세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커(예컨대, 항생제 내성 마커)를 포함할 수 있다. 다양한 숙주 세포주에 핵산을 안정적으로 통합하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 선택 마커(및 AAV cap 및 rep 유전자 및/또는 rAAV 게놈)를 포함하는 핵산이 통합된 세포를 선택하기 위해 (예를 들어, 선택 마커의 사용을 통한) 반복 선택이 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 핵산은 부위-특이적 방식으로 세포주에 통합되어 생산자 세포주를 생성할 수 있다. 몇몇 부위-특이적 재조합 시스템, 예컨대 FLP/FRT(예를 들어, 문헌[O'Gorman, S. *et al*. (1991) *Science* 251:1351-1355] 참조), Cre/loxP(예를 들어, 문헌[Sauer, B. and Henderson, N. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci*. 85:5166-5170] 참조) 및 phi C31-att(예를 들어, 문헌[Groth, A.C. *et al*. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci*. 97:5995-6000] 참조)이 당업계에 알려져 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 영장류 세포주(예를 들어, Vero 또는 FRhL-2 세포주와 같은 비인간 영장류 세포주)로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포주는 인간 세포주로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 PERC.6®(Crucell) 세포로부터 유래된다. 예를 들어, 생산자 세포주를 생성하기 위해 AAV rep 및 cap 유전자를 암호화하는 핵산 및/또는 거대 rAAV 게놈을 세포주에 도입하고/하거나 안정적으로 유지/통합하기 전에, 세포주는 HeLa, 293, A549, 또는 PERC.6®(Crucell) 세포주, 또는 이들의 유도체이다.

[0083] 일부 실시형태에서, 생산자 세포주는 현탁액에서의 성장에 적합하다. 당업계에 알려진 바와 같이, 부착-의존적 세포는 일반적으로 마이크로캐리어 비드와 같은 기질 없이는 현탁액에서 성장할 수 없다. 세포주가 현탁액에서 성장하도록 설계하는 것은, 예를 들어 교반 패들을 갖춘 회전 배양에서의 세포주 성장, 응집을 방지하기 위해 칼슘 및 마그네슘 이온이 없는 배양 배지(및 필요에 따라 소포제)의 사용, 실리콘화 화합물로 코팅된 배양 용기의 사용, 및 각 계대에서 (큰 덩어리나 용기 측면이 아닌) 배양물에서의 세포 선택을 포함할 수 있다. 추가적인 설명에 대해서는, 예를 들어, ATCC 자주 묻는 질문 문서(www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx에서 이용 가능) 및 거기에 인용된 참고문헌을 참조한다.

[0084] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 임의의 rAAV 입자를 생성하는 방법으로서, (a) (i) 하나 이상의 AAV 패키징 유전자(상기 AAV 패키징 유전자 각각은 AAV 복제 및/또는 캡시드화 단백질을 암호화함), (ii) 적어도 하나의 AAV ITR에 의해 측접된 본 명세서에 기재된 바와 같은 이종성 핵산을 암호화하는 핵산을 포함하는 rAAV 프로-벡터, 및 (iii) AAV 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를, rAAV 입자가 생성되는 조건에서 배양하는 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생성된 rAAV 입자를 회수하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 적어도 하나의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, 염소 AAV, 소 AAV, 또는 마우스 AAV 혈청형 ITR 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, 또는 AAVrh10이다. 특정 실시형태에서, AAV의 핵산은 AAV2 ITR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 캡시드화 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV1999, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, 염소 AAV, AAV1/AAV2 키메라, 소 AAV, 마우스 AAV 캡시드, rAAV2/HBoV1 혈청형, AAV-XL32, 또는 AAV-XL32.1 캡시드 단백질 또는 이들의 돌연변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 캡시드화 단백질은 AAV8 캡시드 단백질이다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV2 ITR, 및 치료 이식유전자/핵산을 암호화하는 핵산(예를 들어, ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트)을 포함하는 재조합 게놈 및 AAV9 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV2 ITR, 및 치료 이식유전자/핵산을 암호화하는 핵산(예를 들어, ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트)을 포함하는 재조합 게놈 및 AAV1999 캡시드를 포함한다.

[0085] 본 발명의 적합한 rAAV 생성 배양 배지는 0.5% 내지 20%(v/v 또는 w/v) 수준의 혈청 또는 혈청-유래 재조합 단백질로 보충될 수 있다. 대안적으로, 당업계에 알려진 바와 같이, rAAV 벡터는 동물-유래 생성물이 없는 배지로 언급될 수도 있는 무혈청 조건에서 생성될 수 있다. 당업자는 생성 배양물에서 rAAV의 역가를 높이기 위해, rAAV 벡터의 생성을 지원하도록 설계된 상용 또는 주문제조형 배지에, 글루코스, 비타민, 아미노산, 및/또는 성장 인자를 제한 없이 포함하는 당업계에 알려진 하나 이상의 세포 배양 성분이 또한 보충될 수 있음을 이해할 수 있다.

[0086] rAAV 생성 배양물은 이용되는 특정 숙주 세포에 적합한 다양한 조건(넓은 온도 범위, 다양한 기간 등)에서 성장될 수 있다. 당업계에 알려진 바와 같이, rAAV 생성 배양물은 적합한 부착-의존성 용기, 예를 들어, 회전병, 중

공 섬유 필터, 미세담체, 및 패킹된 베드(packed-bed) 또는 유체화된-베드 생물반응기에서 배양될 수 있는 부착-의존성 배양물을 포함한다. rAAV 벡터 생성 배양물은 또한, 예를 들어, 회전 플라스크, 교반 탱크 생물반응기, 및 일회용 시스템, 예를 들어, 웨이브 백(Wave bag) 시스템을 포함하는 다양한 방식으로 배양될 수 있는 현탁-적합화 숙주 세포, 예를 들어, HeLa, 293, 및 SF-9 세포를 포함할 수 있다.

[0087] 본 발명의 rAAV 벡터 입자는 생성 배양물의 숙주 세포의 용해 또는 생성 배양물로부터 소모된 배지의 수거에 의해 rAAV 생성 배양물로부터 수거될 수 있으나, 단, 상기 세포는 미국 특허 번호 6,566,118호에 더욱 충분히 기재된 바와 같이 온전한 세포로부터 배지로 rAAV 입자를 방출시키는 당업계에 알려진 조건에서 배양되어야 한다. 또한, 세포를 용해하는 적합한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 다수의 동결/해동 사이클, 초음파처리, 미세유체화, 및 화학물질, 예컨대 세제 및/또는 프로테아제를 이용한 처리를 포함한다.

[0088] 추가 실시형태에서, rAAV 입자는 정제된다. 본 명세서에 사용된 용어 "정제"는 rAAV 입자가 자연 발생하는 장소나 최초 제조된 장소에 존재할 수도 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 없는 rAAV 입자의 제조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 rAAV 입자는 배양 용해물 또는 생성 배양 상청액과 같은 공급원 혼합물로부터 상기 입자를 농축시키는 정제 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 농축은 예를 들어, 용액 내에 존재하는 DNase-저항성 입자(DRP) 또는 게놈 복사본(gc)의 비율, 또는 감염력에 의해서와 같이 다양한 방법으로 측정될 수 있거나, 생성 배양 오염물 또는, 헬퍼 바이러스, 배지 성분 등을 비롯한 공정 중 오염물을 포함하는 오염물과 같은, 공급원 혼합물에 존재하는 제2의 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다.

[0089] 일부 실시형태에서, rAAV 생성 배양 채취물은 숙주 세포 파편을 제거하기 위해 청징된다. 일부 실시형태에서, 생성 배양 수거물은, 예를 들어 등급 DOHC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 등급 A1HC Millipore Millistak+ HC Pod 필터, 및 0.2 ㎛ 필터 Opticap XL10 Millipore Express SHC 친수성 막 필터를 포함하는 일련의 심층 필터를 통한 여과에 의해 정화된다. 정화는 또한 당업계에 알려진 다양한 다른 표준 기술, 예를 들어, 원심분리 또는 당업계에 알려진 0.2 ㎛ 이상의 포어 크기의 임의의 셀룰로스 아세테이트 필터를 통한 여과에 의해 달성될 수 있다.

[0090] 일부 실시형태에서, rAAV 생성 배양물 수거물은 생성 배양물에 존재하는 임의의 고분자량 DNA를 분해하기 위해 Benzonase®로 추가로 처리된다. 일부 실시형태에서, Benzonase® 분해는, 예를 들어, 30분 내지 수시간의 기간 동안 주위 온도 내지 37℃의 온도에서 최종 농도 1 내지 2.5 단위/㎖의 Benzonase®를 포함하는 당업계에 알려진 표준 조건에서 수행된다.

[0091] rAAV 입자는 다음 정제 단계 중 하나 이상을 이용하여 단리되거나 정제될 수 있다: 평형 원심분리; 통과액 음이온 교환 여과; rAAV 입자의 농축을 위한 접선류 여과(TFF); 아파타이트 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 헬퍼 바이러스의 열 불활성화; 소수성 상호작용 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획; 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의한 완충액 교환; 나노여과; 및 음이온 교환 크로마토그래피, 양이온 교환 크로마토그래피, 또는 친화성 크로마토그래피에 의한 rAAV 포획. 이들 단계는 단독으로, 다양한 조합으로, 또는 다양한 순서로 이용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 하기 기술된 순서대로 모든 단계를 포함한다. rAAV 입자의 정제 방법은, 예를 들어 문헌[Xiao *et al.*, (1998) Journal of Virology 72:2224-2232]; 미국 특허 6,989,264호 및 8,137,948호; 및 WO 2010/148143에 기재되어 있다.

[0092] **치료 방법**

[0093] 본 개시내용의 특정 양상은 MLD 치료 및/또는 ARSA 폴리펩타이드 수준 증가를 필요로 하는 개체에서 MLD를 치료하고/하거나 ARSA 폴리펩타이드 수준을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트(예를 들어, rAAV 입자로 전달되는 발현 카세트)의 유효량을 투여함으로써 MLD를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, ARSA 폴리펩타이드는 야생형 ARSA 폴리펩타이드이다. ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트(예를 들어, rAAV 입자로 전달되는 발현 카세트)는 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 투여는 직접 척수 주사 및/또는 뇌내 투여를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 대뇌, 연수, 뇌교, 소뇌, 두개강내, 뇌 주위의 수막, 경질막, 거미막, 연질막, 뇌 주위의 거미막밑 공간의 뇌척수액(CSF), 소뇌의 심부 소뇌핵, 대뇌의 뇌실계, 거미막밑공간, 선조체, 피질, 중격, 시상, 시상하부, 및 뇌의 실질로부터 선택된 부위에서 이루어진다. 일부 실시형태에서, 투여는 적어도 하나의 뇌 가쪽뇌실로의 뇌실내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 경부, 흉부, 및/또는 요부 영역 내의 수막강내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 선조체내 주사를 포함한다. 일부 실시형태에서, 투여는 시상내 주사를 포함한다.

[0094] rAAV(일부 실시형태에서는 입자 형태)의 유효량은 치료 목적에 따라 투여된다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입이 원하는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료의 목적은 일반적으로 이러한 수준의 형질도입을 충족시키거나 초과하는 것이다. 일부 경우에, 이러한 수준의 형질도입은 원하는 조직 유형의 표적 세포의 약 1 내지 5%만을, 일부 실시형태에서는 원하는 조직 유형의 세포의 약 20% 이상을, 일부 실시형태에서는 약 50% 이상을, 일부 실시형태에서는 약 80% 이상을, 일부 실시형태에서는 약 95% 이상을, 일부 실시형태에서는 원하는 조직 유형의 세포의 약 99% 이상을 형질도입하여 달성될 수 있다. rAAV 조성물은 동일한 절차 동안, 또는 수일, 수주, 수개월 또는 수년의 간격으로, 1회 이상의 투여에 의해 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 투여 경로 중 하나 이상이 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 인간을 치료하기 위해 다중 벡터가 사용될 수 있다.

[0095] 상기 양상의 일부 실시형태에서, rAAV는 척수에 직접 주사를 통해, 척추강내 주사를 통해 또는 낭내 주사를 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 척수 또는 대수조의 하나 초과의 위치에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 척수의 하나 초과의 위치에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 척수의 허리 거미막밑 공간, 가슴 거미막밑 공간 및 목 거미막밑 공간 중 하나 이상에 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV는 대수조에 투여된다.

[0096] AAV 바이러스 입자에 의해 형질도입된 세포를 식별하는 방법은 당업계에 알려져 있고; 예를 들어, 바이러스 입자(예를 들어, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 rAAV 캡시드를 포함하는 바이러스 입자)의 형질도입을 검출하기 위해 면역조직화학 또는 강화된 녹색 형광 단백질과 같은 마커가 사용될 수 있다.

[0097] 일부 실시형태에서, 유효량의 rAAV 입자는 1개 초과의 부위에 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 유효량의 rAAV 입자는 단일 부위에 1회 초과로(예를 들어, 반복하여) 투여된다. 일부 실시형태에서, rAAV 바이러스 입자의 다회 주사 간격은 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 9시간, 12시간, 또는 24시간 이하이다.

[0098] 일부 실시형태에서, 본 발명은 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 투여하여 MLD가 있는 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 하나 이상의 부형제를 포함한다.

[0099] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 약제학적 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 개체에서 MLD를 치료하기 위해 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예컨대, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 10×10^{12}, 11×10^{12}, 15×10^{12}, 20×10^{12}, 25×10^{12}, 30×10^{12}, 또는 50×10^{12}개의 게놈 복제물/㎖ 중 임의의 수의 게놈 복제물/㎖이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{12} 내지 6×10^{12}, 6×10^{12} 내지 7×10^{12}, 7×10^{12} 내지 8×10^{12}, 8×10^{12} 내지 9×10^{12}, 9×10^{12} 내지 10×10^{12}, 10×10^{12} 내지 11×10^{12}, 11×10^{12} 내지 15×10^{12}, 15×10^{12} 내지 20×10^{12}, 20×10^{12} 내지 25×10^{12}, 25×10^{12} 내지 30×10^{12}, 30×10^{12} 내지 50×10^{12}, 또는 50×10^{12} 내지 100×10^{12}개의 게놈 복제물/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 약 5×10^{12} 내지 10×10^{12}, 10×10^{12} 내지 25×10^{12}, 또는 25×10^{12} 내지 50×10^{12}개의 게놈 복제물/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자) 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 10×10^{9}, 11×10^{9}, 15×10^{9}, 20×10^{9}, 25×10^{9}, 30×10^{9} 또는 50×10^{9}개의 형질도입 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자) 바이러스 역가는 약 5×10^{9} 내지 6×10^{9}, 6×10^{9} 내지 7×10^{9}, 7×10^{9} 내지 8×10^{9}, 8×10^{9} 내지 9×10^{9}, 9×10^{9} 내지 10×10^{9}, 10×10^{9} 내지 11×10^{9}, 11×10^{9} 내지 15×10^{9}, 15×10^{9} 내지 20×10^{9}, 20×10^{9} 내지 25×10^{9}, 25×10^{9} 내지 30×10^{9}, 30×10^{9} 내지 50×10^{9} 또는 50×10^{9} 내지 100×10^{9}개의 형질도입 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자) 바이러스 역가는 5×10^{9} 내지 10×10^{9}, 10×10^{9} 내지 15×10^{9}, 15×10^{9} 내지 25×10^{9}, 또는 25×10^{9} 내지 50×10^{9} 형질도입 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 10×10^{10}, 11×10^{10}, 15×10^{10}, 20×10^{10}, 25×10^{10}, 30×10^{10}, 40×10^{10}, 또는 50×10^{10}개의 감염성 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들

어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10} 내지 6×10^{10}, 6×10^{10} 내지 7×10^{10}, 7×10^{10} 내지 8×10^{10}, 8×10^{10} 내지 9×10^{10}, 9×10^{10} 내지 10×10^{10}, 10×10^{10} 내지 11×10^{10}, 11×10^{10} to 15×10^{10}, 15×10^{10} 내지 20×10^{10}, 20×10^{10} 내지 25×10^{10}, 25×10^{10} 내지 30×10^{10}, 30×10^{10} 내지 40×10^{10}, 40×10^{10} 내지 50×10^{10}, 또는 50×10^{10} 내지 100×10^{10}개의 감염성 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 입자)의 바이러스 역가는 적어도 약 5×10^{10} 내지 10×10^{10}, 10×10^{10} 내지 15×10^{10}, 15×10^{10} 내지 25×10^{10}, 또는 25×10^{10} 내지 50×10^{10}개의 감염성 단위/㎖ 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 바이러스 입자는 rAAV 입자이다. 일부 실시형태에서, rAAV 입자는 AAV1999 캡시드 단백질을 포함한다.

[0100] 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 체중 1 kg당 적어도 약 1×10^{8}개 내지 약 6×10^{13}개의 게놈 복제물이다. 일부 실시형태에서, 개체에 투여되는 바이러스 입자의 용량은 체중 1 kg당 약 1×10^{8}개 내지 약 6×10^{13}개의 게놈 복제물이다. 일부 실시형태에서, 개체에게 투여되는 바이러스 입자의 용량은 약 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 13×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 또는 1×10^{13}개의 게놈 복제물/체중(kg) 중 어느 것이다.

[0101] 일부 실시형태에서, 개체에게 투여되는 바이러스 입자의 총량은 적어도 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{14}개의 게놈 복제물 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 개체에게 투여되는 바이러스 입자의 총량은 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{14}개의 게놈 복제물 중 어느 것이다. 일부 실시형태에서, 개체에게 투여되는 바이러스 입자의 총량은 약 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 13×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13}, 9×10^{13}, 또는 1×10^{14}개의 게놈 복제물 중 어느 것이다.

[0102] 본 발명의 조성물(예컨대, 본 발명의 ARSA 폴리펩타이드를 암호화하는 벡터를 포함하는 재조합 바이러스 입자)은 단독으로 사용되거나 MLD를 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다. 순차적 투여의 간격은 수분, 수시간, 또는 수일 이상(또는 대안적으로, 미만)의 단위일 수 있다.

[0103] rAAV(일부 실시형태에서는 입자 형태)의 유효량은 치료 목적에 따라 투여된다. 예를 들어, 낮은 백분율의 형질도입이 원하는 치료 효과를 달성할 수 있는 경우, 치료의 목적은 일반적으로 이러한 수준의 형질도입을 충족시키거나 초과하는 것이다. 일부 경우에, 이러한 수준의 형질도입은 표적 세포의 약 1 내지 5%만을, 일부 실시형태에서는 원하는 조직 유형의 세포의 적어도 약 20% 이상을, 일부 실시형태에서는 적어도 약 50% 이상을, 일부 실시형태에서는 적어도 약 80% 이상을, 일부 실시형태에서는 적어도 약 95% 이상을, 일부 실시형태에서는 원하는 조직 유형의 세포의 적어도 약 99% 이상을 형질도입하여 달성될 수 있다. rAAV 조성물은 동일한 절차 동안, 또는 수일, 수주, 수개월, 또는 수년의 간격으로, 1회 이상의 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류(예컨대, 인간)를 치료하기 위해 다중 벡터가 사용될 수 있다.

[0104] 일부 실시형태에서, 본 발명의 rAAV 조성물은 인간에게 투여하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 rAAV 조성물은 소아 투여를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV(일부 실시형태에서는 입자 형태)의 유효량은 1개월 미만, 2개월 미만, 3개월 미만, 4개월 미만, 5개월 미만, 6개월 미만, 7개월 미만, 8개월 미만, 9개월 미만, 10개월 미만, 11개월 미만, 1년 미만, 13개월 미만, 14개월 미만, 15개월 미만, 16개월 미만, 17개월 미만, 18개월 미만, 19개월 미만, 20개월 미만, 21개월 미만, 22개월 미만, 2세 미만, 3세 미만, 5세 미만 또는 7세 미만의 환자에게 투여된다.

[0105] 일부 실시형태에서, 본 발명의 rAAV 조성물은 청소년에게 투여하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV(일부 실시형태에서는 입자 형태)의 유효량은 12세 미만, 13세 미만, 14세 미만, 15세 미만, 16세 미만, 17세 미만, 18세 미만, 19세 미만, 20세 미만, 21세 미만, 22세 미만, 23세 미만, 24세 미만, 또는 25세 미만의 환자에게 투여된다.

[0106] **키트 또는 제조 물품**

[0107] 발현 카세트(예를 들어, 야생형 인간 ARSA 폴리펩타이드와 같은 ARSA 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 발현 카세트), rAAV 벡터, 입자, 및/또는 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법들 중 하나에 사용하기 위해 설계된 키트 또는 제조 물품 내에 들어있을 수 있다.

[0108] 일반적으로, 이러한 시스템은 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 캐뉼라, 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 이상)의 주사기, 및 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 이상)의 유체를 포함한다.

[0109] 주사기는 유체 전달용 캐뉼라에 연결될 수 있다면 임의의 적합한 주사기일 수 있다. 일부 실시형태에서, 시스템은 하나의 주사기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 시스템은 2개의 주사기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 시스템은 3개의 주사기를 갖는다. 일부 실시형태에서, 시스템은 4개 이상의 주사기를 갖는다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 유체는 본 명세서에 기재된 것들, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 이상의 벡터의 유효량을 각각 포함하는 하나 이상의 유체, 및 하나 이상의 치료제를 포함하는 하나 이상의 유체를 포함한다.

[0110] 일부 실시형태에서, 키트는 단일 유체(유효량의 벡터를 포함하는 약제학적으로 허용 가능한 유체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 2개의 유체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 3개의 유체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 4개 이상의 유체를 포함한다. 유체는 본 개시내용의 ARSA 폴리펩타이드 또는 rAAV 벡터 조성물을 발현시키기 위한 발현 카세트의 전달, 희석, 안정화, 완충, 또는 그 외 수송에 적합한 희석제, 완충제, 부형제, 또는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 임의의 다른 액체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 완충제, 예를 들어 수성 pH 완충 용액을 포함한다. 완충제의 예는 포스페이트, 시트레이트, Tris, HEPES, 및 기타 유기산 완충제를 제한없이 포함할 수 있다.

[0111] 일부 실시형태에서, 키트는 용기를 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들어, 바이알, 백, 주사기 및 보틀을 포함할 수 있다. 용기는 유리, 금속 또는 플라스틱과 같은 하나 이상의 재질로 만들어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 용기는 본 발명의 rAAV 조성물을 수용하기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 용기는 유체 및/또는 다른 치료제를 수용할 수도 있다.

[0112] 일부 실시형태에서, 키트는 본 발명의 rAAV 조성물과 함께 추가 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 혼합될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 분리 보관될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 동일한 용기에 수용될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 서로 다른 용기에 수용될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물과 추가 치료제는 같은 날에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물은 추가 치료제의 투여 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 2주, 3주, 4주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월 내에 투여될 수 있다.

[0113] 일부 실시형태에서, 키트는 AAV 투여 전에 면역계를 일시적으로 억제하는 치료제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 환자는 AAV 입자에 대한 T세포 반응을 저해하기 위해 바이러스 주사 직전과 직후에 일시적으로 면역 억제된다(예를 들어, 문헌[Ferreira et al., Hum. Gene Ther. 25:180-188, 2014] 참조). 일부 실시형태에서, 키트는 사이클로스포린, 미코페놀레이트 모페틸, 및/또는 메틸프레드니솔론을 추가로 제공한다.

[0114] 또한, 본 발명의 rAAV 입자 및/또는 조성물은 사용 설명서를 포함하는 키트로 패키징될 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 rAAV 입자 조성물의 전달(예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 유형의 비경구 투여)을 위한 장치를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 사용 설명서는 본 명세서에 기재된 방법 중 하나에 따른 지침을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지침은 용기와 함께 제공되는(예를 들어, 용기에 부착되는) 라벨에 인쇄된다. 일부 실시형태에서, 사용 설명서는, 예를 들어 개체에서 MLD를 치료하기 위한, rAAV 입자의 유효량을 개체(예컨대, 인간)에게 투여하기 위한 지침을 포함한다.

[0115] **실시예**

[0116] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더욱 완전하게 이해될 것이다. 그러나, 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시를 위한 것이며, 이러한 관점에서 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 제안될 것이고 본 출원의 사상 및 범주와 첨부된 실시형태의 범위 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다.

[0117] **일반적인 방법**

[0118] ***조직 균질화***

[0119] 냉장시킨 Omni 조직 분쇄기(bead ruptor)(20초 주기 4.7 진동/초)에서 1.4 ㎜ 세라믹 비드 균질화 튜브에 차가

운 10mM Tris 1mM EDTA 완충제를 첨가하여 조직을 균질화하였다. 균질화 후에, 후속 분석을 위해 분취액을 만들었다.

[0120] ***설파타제 활성을 위한 조직 가용화***

[0121] 균질화된 조직에, Nonidet P-40을 0.1% 최종 농도로 첨가하고, 오비탈 진탕기에서 4℃에서 1.5시간 동안 가용화시키고, 이어서, 18,000 *x g*에서 20분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 제거하고, 얼음 상의 에펜도르프관에 옮겼다.

[0122] ***BCA 검정***

[0123] 물에 희석시킨 10 ul 상청액을 사용하여 BCA(비신코닌산) 검정(Thermo Scientific 23227)에 의해 총 단백질 농도를 결정하였다. 562 nm에서의 흡광도에 의해 비신코닌산(BCA)에 의한 구리 양이온(Cu^{1+})의 비색 검출. 96웰 미량정량판을 판독하기 위해 사용한 SoftMax Pro 버전 5.4.4 소프트웨어가 있는 Molecular Devices SpectraMax 340PC-384.

[0124] ***설파타제 활성***

[0125] 4-니트로카테콜 설페이트(PNCS) 기질로부터 가수분해된 4-니트로카테콜(PNC)에 대한 설파타제 활성 검정을 사용하여 10 마이크로리터의 정제된 상청액을 총 설파타제 활성에 대해 검정하였다. (Abcam Ab204731). PNC 표준 곡선 및 515 nm에서의 판독 흡광도에 대해 샘플의 가수분해된 4-니트로카테콜(PNC)에 의해 활성을 결정하였다. 설파타제 활성을 mU/mg(nmol/min/mg)로 보고하였다. 96웰 미량정량판을 판독하기 위해 사용한 SoftMax Pro 버전 5.4.4 소프트웨어가 있는 Molecular Devices SpectraMax 340PC-384.

[0126] ***지질 추출***

[0127] 조직 균질액(또는 유체)의 분취액을 20 내지 100× 추출 용액(10 ng/㎖ C17-설파타이드를 보충한, 5 mM 암모늄 포르메이트, 아세토나이트릴:메탄올(70:30) 중 0.2% 포름산)으로 추출하였다. 10분 동안 격렬하게 혼합한 후에, 샘플을 5분 동안 방치한 후에, 다시 빠르게(30s) 교반하였다. 모든 샘플을 8,400 rpm에서 10분 동안 4℃에서 원심분리시켰다. LC-MS 분석을 위해 상청액(200 ㎕)의 분취액을 비활성화된 Q-sert 바이알에 옮겼다.

[0128] C16, C18, C24 및 C24:1 사슬 길이를 갖는 설파타이드(Matreya) 및 C18 2R-OH 설파타이드 및 라이소-설파타이드(Avanti)를 사용하여 동일한 추출 용액에서 표준 곡선(선형성 범위 0.03 내지 1000 ng/㎖, 2×- 연속 희석)을 준비하였다.

[0129] ***설파타이드의 LC-MS 분석***

[0130] Waters Acquity UPLC 시스템(매사추세츠주 밀퍼드 소재)을 다음의 매개변수를 이용하여 음이온 모드에서 작동하는 ESI 소스가 구비된 Qtrap 6500 질량분석기 시스템(매사추세츠주 프레이밍햄 소재)에 연결하였다: 커튼 가스 25.0; 이온 스프레이 전압 -4.5 kV; 온도 500℃; 이온 소스 가스: 50 및 70; 디클러스터링 전위 -80 V; 입구 전위 -10 V; 충돌 에너지 -155 V; 및 충돌 셀 출구 전위 -15 V.

[0131] 설파타이드 종은 Waters Acquity UPLC BEH 아마이드에서 분리되었다(1.7 μ, 2.1×100 mm, P/N: 186004801). 오토샘플러 및 칼럼 오븐을 각각 10℃ 및 20℃에서 유지시켰다. 이동상은 용매 A(95:5의 아세토나이트릴:물 중 5 mM 암모늄 포르메이트) 및 용매 B(90:10 메탄올:물 중 5 mM 암모늄 포르메이트)로 이루어졌다.

[0132] 구배 프로그램은 0% B에서 시작되어, 2분 동안 유지된 후에, 0% B 내지 100% B의 선형 곡선을 따랐다. 100% B에서 1분 더 경과된 후, 이는 0% B에서 다시 평형상태가 되었다. 모든 설파타이드 종은 C17-설파타이드의 내부 표준에 정규화되고, 상응하는 표준 설파타이드의 표준 곡선으로 계산한다.

[0133] ***니트로블루 수초 염색***

[0134] 절편을 12-웰 플레이트에 옮기고, 자유-유동 절편에서 모든 단편을 수행한다. 진탕기의 TBA에서 절편을 2×1분 세척한다. 니트로블루 용액(Sigma cat#N5374)에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 진탕기의 TBA 중에서 2×5분 린스한다. DAB 염색(Sigma Kit cat# D4293) 절편을 1시간 동안 인큐베이션시키고, RO 워터에서 2×1 린스한다. PBS에서 1분 동안 절편을 린스하고, PBS 중에서 시작하고, 슬라이드를 공기 건조시킨다. 2분 동안 뉴트럴 레드(Neutral Red)로 대비염색하고, RO 워터에서 2×2 세척한다. 슬라이드를 95% 시약 알코올에서 1분, 100% 시약 알코올에서 2×2분, 자일렌에서 2×2분 린스하고, Acrytol 장착 매질을 사용하여 커버슬립을 린스한다.

[0135] *GFP ELISA*

[0136] Abcam(ab171581)로부터의 GFP SimpleStep ELISA® 키트를 사용하여 GFP 단백질의 측정을 완료하였다. 일부 시약 농도는 상이한 로트, 특히 표준에 의해 변하기 때문에, 각 키트 로트와 함께 제공된 프로토콜 삽입물을 읽는 것이 중요하다.

[0137] 시작하기 전에, 모든 키트 성분을 실온(18 내지 25℃)으로 적어도 30분 동안 평형상태로 만들었다. 단백질-처리 조직 균질액의 분취액을 얼음에서 해동시켰다. 시약 및 작업 표준은 키트 지침에 따라 새로 준비하였다. 샘플을 다음과 같이 다음과 같이 완전한 세포 추출 완충제에서 희석시켰다: 회색질 1:5, 척수 1:5, 심장: 1:5, 간 1:20. 희석된 샘플 및 표준을 적절한 웰에 첨가한 후에, 항체 칵테일을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 밀봉시키고, 400 RPM에서 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 웰을 세척 완충제로 3회 세척하였고, 액체의 완전한 제거를 보장하였다. TMB 용액을 각 웰에 첨가하였고, 400 RPM에서 진탕하면서 10분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션시켰다. TMB 인큐베이션 후에 신속하게, 정지 용액을 각 웰에 첨가하였고, 플레이트 진탕기에서 1분 동안 혼합하였다. 플레이트를 Softmax 소프트웨어를 사용하여 SpectraMax 플레이트 판독기(Molecular Devices) 상에서 450 nm에서 판독하였다.

[0138] *FLAG IHC*

[0139] 항원 회수를 위해 NHP 뇌 FFPE 슬라이드를 EDTA 용액(pH.9.0) 중에서 20분 동안 90℃에서 처리한 후에, 3% 과산화수소로 5분 동안 차단시켰다. 이어서, 슬라이드를 항체 희석제(Cell Signaling #8112)에서 1시간 동안 실온에서 1:200 희석으로 Flag DDK 항체(Abcam ab205606)와 함께 인큐베이션시킨 후에, 항-토끼 HRP(Abcam ab6721) 2차 항체 인큐베이션이 이어졌다. **Flag DDK** 신호에 대한 발색은 실온에서 3분 동안 DAB 용액에서 슬라이드를 인큐베이션시킴으로써 달성되었고, 후속적으로, 핵 염색을 위해 슬러이드를 헤마톡실린으로 대비염색시켰다.

[0140] *GFP IHC*

[0141] 항원 회수를 위해 NHP 뇌 FFPE 슬라이드를 EDTA 용액(pH.9.0) 중에서 20분 동안 90℃에서 처리하고, 후속적으로 3% 과산화수소로 10분 동안 차단한 후에, 45분 동안 실온에서 5% 말 혈청으로 차단하였다. 이어서, 슬라이드를 항체 희석제(Cell Signaling #8112)에서 1시간 동안 실온에서 1:500 희석으로 GFP 항체(ThermoFisher A-11122)와 함께 인큐베이션시킨 후에, 항-토끼 HRP(Abcam ab6721) 2차 항체 인큐베이션이 이어졌다. **GFP** 신호에 대한 발색은 실온에서 3분 동안 DAB 용액에서 슬라이드를 인큐베이션시킴으로써 달성되었고, 핵 염색을 위해 슬러이드를 헤마톡실린으로 대비염색시켰다.

[0142] *교차 교정 분석*

[0143] 인접한 5 ㎛ FFPE 절편을 ARSA IHC와 DAPI 또는 WPRE ISH와 DAPI 중 하나에 처리하였다. 이어서, 개개 타일을 봉합하여 IHC와 ISH 이미지 모두에 대한 시상 단면을 얻었다. 이어서, 이들 이미지를 변환 매트릭스(회전 및 병진 매개변수)를 사용하여 전체적으로 등록하여 IHC 및 ISH 이미지를 정렬하였다. 이어서, 시상단면 내의 개개 타일을 DAPI를 사용하여 국부적으로 등록하여 개개 IHC와 ISH 타일 간의 양호한 정렬을 보장하였다. 각 타일에서, 전체 시상단면에 걸쳐 경험적으로 결정한 임계값 매개변수에 의해 IHC 양성 세포 및 ISH 양성 세포를 추정하였다. ISH의 경우에, IHC 양성 세포는 진정한 ISH 신호로 계수되기 위해 적어도 20% 중첩되어야 했다. IHC 이미지의 경우, 역치값 매개변수를 결정하기 위해 ARSA 염색이 없는 음성 대조군을 사용하였다. IHC 양성 세포 대 ISH 양성 세포의 비인 교차-교정 인자를 각 타일에 대해 추정하였고, 히트맵으로 나타냈다.

[0144] *단일-핵 서열분석*

[0145] **핵 단리:** 핵 단리를 위해, 해부된 뇌를 마이크로원심분리관에 옮기고, 드라이 아이스와 에탄올의 슬러리 중에 급속 냉동시키고, 사용 시까지 -800℃에서 보관하였다. 핵을 단리시키기 위해, 냉동된 마우스 뇌를 1 ㎖ Dounce 균질기(Wheaton)에서 0.1% Triton-100(Sigma-Aldrich), 1 mM DTT(Sigma-Aldrich(, 및 0.2 U/㎕ RNase 저해제(Sigma-Aldrich)를 함유하는 핵 용해 완충제에 넣었다. 느슨한 Dounce 막자를 10회 사용한 후에 단단한 막자를 10회 사용하여 조직을 균질화시키고, 얼음 상에서 15분 동안 인큐베이션시켰다. 얻어진 균질액을 30 ㎛ 셀 스트레이너(Miltenyi Biotech)에 통과시키고, 500×g에서 5분 동안 원심분리시켜 핵을 펠릿화하였다. 1×PBS(Thermo Fisher), 1% 뉴클레아제 무함유(nuclease-free) BSA(Sigma-Aldrich), 1 mM DTT(Sigma-Aldrich) 및 0.2 U/㎕ RNase 저해제(Sigma-Aldrich)를 함유하는 완충제에서 핵을 재현탁시켰다. PE에 접합된 마우스 항-NeuN(EMD Millipore)를 1:500의 희석으로 제제에 첨가하였고, 샘플을 30분 동안 40℃에서 인큐베이션시켰다. 이어서, 샘플을 5분 동안 500×g에서 원심분리시켜 핵을 펠릿화하고, 펠릿을 1×PBS, 1% BSA, 1 mM DTT, 및 0.2 U/㎕

RNase 저해제에서 재현탁시켰다. DAPI를 0.1 ㎍/㎖의 농도로 첨가하였다. 100 ㎛ 노즐을 사용하여 Influx-83(BD Biosciences) 상에서 단일 핵 분류를 수행하였다. 핵을 DAPI 및 NeuN 신호(PE)에 대해 개폐하였다.

[0146] ***라이브러리 제조 및 NovaSeq 시퀀싱***

[0147] Chromium Single Cell 3' 유전자 발현 V3.1 키트에 대한 10xGenomics 프로토콜에 따라 라이브러리를 제조하였다. 간략히 말해서, 분류 직후에, 핵을 90% NeuN- 및 10% NeuN+ 핵과 혼합하였다. 10× 게놈 유전자 발현 키트(10xGenomics)에서 GEM 생성 단계를 수행하였다. GEM 생성 후에, 추가 단계를 위해 샘플을 -20℃에서 유지하였다. 모든 샘플을 cDNA 증폭, 라이브러리 작제로부터 라이브러리 시퀀싱까지 함께 처리하였다. cDNA 및 라이브러리의 정량화는 모든 샘플에 대해 견고하였다. illumine Novaseq 6000 상에서 라이브러리를 시퀀싱하였다. 라이브러리를 대략 50K 판독/핵의 중앙값 깊이에서 시퀀싱하였다. UMI 계수 매트릭스를 Cell Ranger V5에서 생성하였다.

[0148] 데이터 전처리: 생성된 계수 매트릭스는 핵 바코드 및 유전자 라벨과 함께 Partek Flow에 로딩하였다. 품질 관리(QC)를 위해, 바이올린 플롯 검사에 기반하여 표준 프로토콜에 따라 핵을 필터링하였다. 세부 컷오프는 250 < nFeature_RNA < 6000 및 nCount_RNA < 30000이었다. 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자는 2% 미만이었다. 품질 필터링 후에, 추가 분석을 위해 147313개의 핵을 남겨 두었다.

[0149] ***벡터 게놈 평가***

[0150] HT gDNA 단리: 제조업자의 프로토콜 "QIAamp® 96 DNA QIAcube® HT Handbook"에 따라 QIAmp 96 DNA QIAcube HT 키트(cat# 51331)를 사용하여 50 ㎕ NHP 조직 균질액으로부터 gDNA를 단리시켰다. 조직 균질액을 먼저 56℃에서 밤새 프로테이나제 K로 처리하였고, 이어서, S 블록에 옮기고, QIAcube HT Prep Mange Softer ware를 이용하는 gDNA 단리를 수행하는 QIAcube HT 기기에 샘플을 넣는다. 이어서, NANODROP 8000(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 gDNA 농도를 측정하였다.

[0151] QIAcuty를 통한 dPCR: QIAGEN에 의해 제조된 QIAcuty를 통해 dPCR을 이용하여 벡터 게놈을 결정하였다. NHP 조직으로부터 단리된 7 ㎍의 gDNA 및 1× 프로브 PCR 마스터 믹스(cat# 250103)를 함유하는 5 ㎕의 마스터 반응 믹스; 1×프라이머-프로브 믹스1(BGH) 및 믹스2(하우스키핑 유전자); 0.25U의 HindIII 제한효소를 표준 PCR 플레이트에서 혼합하였고, 이어서, 나노플레이트에 옮겼다. 총 반응 용적은 웰당 12 ㎕이다. 이어서, 나노플레이트를 QIAcuity 기기에 배치하고, 제조업자 권장 주기를 사용하여 dPCR을 수행한다. 각 샘플 및 각 유전자에 대한 DNA 복제물을 소프터 웨어(softer ware)에 의해 자동으로 분석하였다. 이어서, 세포당 벡터 게놈을 다음과 같이 계산하였다: 2×BGH 복제물을 하우스키핑 유전자로 나눔.

[0152] **실시예 1. 두 상이한 발현 카세트를 이용하는 생체내 ARSA 발현**

[0153] 구성적 키메라 CMV-닭 β-액틴(CBA) 프로모터에 의해 유도되는 인간 코돈 최적화된 아릴설파타제 A(*ARSA*) 유전자(서열번호 2)를 발현시키도록 벡터 페이로드를 설계하였다. 이식유전자 발현은 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE)를 추가하여 더욱 향상된다. 서열번호 3은 5' AAV2 ITR(서열번호 4) 및 3' AAV2 ITR(서열번호 5), CMV 인핸서 요소(서열번호 6), 닭 β-액틴 프로모터(서열번호 7) 및 WPRE 요소(서열번호 8)를 포함하는 rAAV 패키징을 위한 플라스미드의 대표적인 완전한 DNA 서열을 나타낸다. rAAV 입자 생산에 대한 특정 플라스미드의 맵의 개략도를 **도 17**에 나타낸다. 플라스미드의 특정 요소를 표 1에 열거한다.

표 1

5'ITR에서 3'ITR로의 서열 주석

서열 넘버링	주석
1 - 145	AAV2 5'ITR
173-553	CMV 인핸서 요소
554-873	닭 b-액틴 프로모터
874-924	엑손 1 닭 b-액틴
925-1799	인트론 1 닭 b-액틴
1808-1848	인트론 2 토끼 베타 글로빈
1849-1902	엑손 3 토끼 베타 글로빈
1914-3443	코돈 최적화된 인간 ARSA
3446-4030	WPRE 요소
4043-4245	폴리A 신호 서열; 소 성장 호르몬 유전자 폴리아데닐화 서열
4253-4397	플립 배향의 AAV2 3 ITR 요소

[0154]

[0155] 생후 2일에 $ARSA^{-/-}$ 마우스에 PBS 또는 WPRE 요소 유무와 상관없이 인간 ARSA를 발현시키는 AAV9(2e11VGs; 2e14VG/kg) rAAV 바이러스 입자를 IV(양쪽 안구뒤 주사) 투여하였다. 두 발현 카세트를 **도 1a**에 도식화한다. **도 1b**는 바이러스 입자의 투여 후에 전뇌, 중간뇌 및 후뇌에서 hARSA 발현의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 발현 수준을 $ARSA^{-/-}$ 마우스 및 정상 수준의 ARSA를 발현시키는 마우스(즉, WT 마우스)의 발현 수준과 비교한다.

[0156] **도 1b**에 나타낸 바와 같이, 2개의 발현 카세트를 포함하는 바이러스 입자의 투여 후에 발현 수준은 증가된다. 발현 카세트에서 WPRE 요소의 포함은 WPRE 요소가 없는 발현 카세트에 비해 ARSA의 증가된 발현 수준을 제공한다.

[0157] 다음에, LC-MS를 사용하여 C24-ST 수준을 측정하였다. ST 수준을 조직 중량에 대해 정규화시켰다. **도 1c**는 2개의 발현 카세트를 포함하는 바이러스 입자의 투여 후에 전뇌, 중간뇌 및 후뇌에서의 CST 수준을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차와 함께 평균을 나타낸다. Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA. $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$. ELN: 20200205-188, 20200305-152, 20200205-006. WPRE 요소가 없는 발현 카세트를 포함하는 $ARSA^{-/-}$ 마우스에 대한 AAV9 입자의 투여 후 C24-ST 수준은 $ARSA^{-/-}$ 마우스에서의 C24-ST 수준에 비해 유의미하게 감소되었다. WPRE 요소가 있는 발현 카세트를 포함하는 $ARSA^{-/-}$ 마우스에 대한 AAV9 입자의 투여 후에 C24-ST 수준의 추가 감소가 관찰되었다.

[0158] **실시예 2. AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여한 $ARSA^{-/-}$ 마우스에서의 설파타제 활성의 평가**

[0159] 후기(13개월) $ARSA^{-/-}$마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE(동물당 1.97e11VG)를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 $ARSA^{-/-}$ 마우스에 제형 완충제를 주사하였다. 투여 3개월 후에, 마우스를 안락사시키고, 뇌, 척수 및 간을 수집하였다. ARSA-매개 설파타제 활성을 설파타제 활성 분석 키트(ab204731)를 사용하여 측정하였고; 데이터를 BCA 분석에 의해 측정된 총 단백질에 대해 정규화하였다. 오차 막대는 표준 편차와 함께 평균을 나타낸다. Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA. $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$; $****p<0.0001$. ELN: 20201205-001, 20210225-107, 20210211-117. **도 2**에 나타낸 바와 같이, AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD($ARSA^{-/-}$) 마우스가 뇌, 척수 및 간에서 증가된 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다는 것을 보여준다.

[0160] **실시예 3. AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여한 ARSA$^{-/-}$ 마우스에서의 설파타이드의 평가**

[0161] MLD 환자에서의 설파타이드 침착은 독성 및 뉴런 사멸의 주된 유발자이다. 단쇄 지방산(C16, C18)은 대게 뉴런 및 성상세포에서 축적되는 반면, 장쇄 지방산 설파타이드(C24:1, C24)는 수초 형성 세포에서 축적된다. 설파타이드의 탈아실화된 형태인 라이소-설파타이드는 MLD 환자의 모든 조직에서 축적된다.

[0162] 후기(13개월) ARSA$^{-/-}$(ARSA KO) 마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 ARSA$^{-/-}$에 제형 완충제를 주사하였다. 투여 3개월 후에, 마우스를 안락사시키고, 뇌 및 척수를 수집하였다. LC-MS를 사용하여 설파타이드 수준을 측정하였다. 조직 중량에 대해 정규화된 데이터: ng/mℓ(50 ㎕)에서 ㎍/g로 전환시킴. 오차 막대는 표준 편차와 함께 평균을 나타낸다. Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 분산 분석.

[0163] LC-MS를 사용하여 설파타이드 수준을 측정하였고, AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여한 ARSA$^{-/-}$ 마우스에서 뇌와 척수 샘플 모두 모든 설파타이드 아이소폼 수준의 유의미한 감소를 나타냈다(**도 3**).

[0164] **실시예 4. AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여한 ARSA$^{-/-}$ 마우스에서의 수초화의 평가**

[0165] MLD 환자는 백질 신경로에서의 수초화의 상당한 손실을 나타낸다. 후기(13개월) ARSA$^{-/-}$ 마우스에 대한 유전자 요법의 영향을 다루기 위해, 마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 ARSA$^{-/-}$에 제형 완충제를 주사하였다. 투여 3개월 후 매칭되는 시상면 뇌 반절편을 니트로블루로 염색하고, 특히 뇌량에서 신호 강도 정량화를 수행하였다. 오차 막대는 표준 편차와 함께 평균을 나타낸다. Tukey 다중 비교 검정을 이용한 일원 분산 분석. AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 후기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스는 대조군에 비해 개선된 뇌량 수초화를 나타낸다(**도 4**).

[0166] **실시예 5. AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여한 ARSA$^{-/-}$ 마우스에서 수초-형성 및 성숙 희소돌기아교세포 세포 수의 평가**

[0167] 후기(13개월) MLD ARSA$^{-/-}$ 마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 ARSA$^{-/-}$ 마우스에 제형 완충제를 주사하였다. 뇌 반구를 급속 냉동하여 수집하였고; 소뇌, 뇌간 및 후각 돌기를 해부하였다. 뇌의 나머지를 단일 핵 RNAseq를 위해 처리하여 상이한 세포 유형의 상대 존재비를 측정하였다. 오차 막대는 표준 편차와 함께 평균을 나타낸다. Tukey 다중 비교를 이용한 이원 분산 분석. **도 5**는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 ARSA$^{-/-}$ 마우스가 비처리 ARSA$^{-/-}$마우스에 비해 희소돌기아교세포 세포수의 정규화를 나타냈다는 것을 보여준다.

[0168] **실시예 6. ARSA 단백질 교차-교정 연구**

[0169] 후기(13개월) ARSA$^{-/-}$에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 투여 3개월 후에, ARSA-mRNA 원위치 혼성화(ISH) 및 ARSA-단백질 면역조직화학(IHC)을 매칭된 시상면 뇌-반절편에서 수행하였다. 절편을 영상화하고, 신호 중첩에 대해 분석하였다. (**도 6a**) 마우스 뇌로부터의 인접한 시상단면을 핵에 대한 DAPI 염색으로 WPRE ISH 또는 ARSA IHC에 대해 처리하였다. 이어서, 시상단면을 개개 1024×1024 픽셀 타일로서 분석하였다. 각 타일에서, 전체 시상 영상에 걸쳐 경험적으로 결정한 임계값 매개변수에 의해 ISH 양성 세포 및 IHC 양성 세포 양성 세포를 결정하였다. IHC+ 세포 대 ISH+ 세포의 비인 교차-교정 인자는 적색 음영으로 나타낸 상당히 교차-교정된 타일이 있는 히트맵으로 나타낸다(도 **6b**). 각 타일로부터의 ISH+ 세포 수 대 IHC+ 세포 수를 산점도로 플롯팅하며, y=x 선은 적색으로 나타낸다. y=x 라인 위의 타일은 교차-교정 세포를 나타낸다. 후기-신경병증 마우스에서, 감염 세포에 비해 10배 더 높은 세포를 교차 교정하여, 이 전략에 의해 달성한 광범위 교차 교정을 강조하였다.

[0170] **실시예 7. MLD-관련 병리의 반전을 초래한 초기(6개월) 신경병리학적 단계의 MLD 마우스(*Arsa*$^{-/-}$)에서 AAV.rh10-h*ARSA*-WPRE 매개 유전자 대체의 평가**

[0171] 초기(6개월) ARSA$^{-/-}$ 마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 ARSA$^{-/-}$ 마우스에 제형 완충제를 주사하였다. 투여 4개월 후에, 인간 ARSA에 대해 IHC에 의해 시상 뇌 절편에서 광범위한 ARSA 발현이 관찰되었다(**도 7a**). 동일한 동물에서, 뇌, 척수, DRG 및 간은 ARSA 활성의 유의미한 증가를 나타냈

다(**도 7b**). 따라서, AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 처리 조기 MLD(ARSA$^{-/-}$) 마우스는 뇌, 척수, DRG 및 간에서 광범위한 CNS 인간 ARSA 발현 및 증가된 ARSA-매개 설파타제 활성을 나타낸다.

[0172] **실시예 8. 초기(6개월) 신경병리학적 단계에서 MLD 마우스(*Arsa*$^{-/-}$)에서의 AAV.rh10-h*ARSA*-WPRE 매개 유전자 대체의 설파타이드 수준의 평가**

[0173] 초기(6개월) ARSA$^{-/-}$ 마우스에 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 ARSA$^{-/-}$ 마우스에 제형 완충제를 주사하였다. 투여 4개월 후에, 동물을 안락사시키고, (**A**) 뇌 및 척수, (**B**) 간, (**C**) 혈장 및 (**D**) CSF를 수집하였다. LC-MS를 사용하여 설파타이드 수준을 측정하였다. 데이터를 조직 중량에 대해 정규화시켰다: ng/㎖(50 ㎕)에서 ㎍/g로 전환시킴. 유체: 데이터를 (30 ㎕) ng/㎖에서 ng/㎖로, 그리고 ng/㎖(5 ㎕)에서 ng/㎕로 전환시킴. **도 8a 내지 도 8d**는 뇌(**도 8a**), 간(**도 8b**), 혈장(**도 8c**) 및 CSF(**도 8d**)에서의 설파타이드 수준을 나타낸다. 설파타이드 수준은 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE의 투여 후 뇌, 척수, 간, 혈장 및 CSF에서 유의미하게 증가되었다.

[0174] **실시예 9: 비인간 영장류(NHP)를 이용하는 연구 - 설파타제 활성**

[0175] AAVrh.10에 대해 혈청음성인 사이노몰거스 원숭이(수컷, 마우리티안(Mauritian) 2세, 2 내지 3 kg)에게 요부에 삽입된 포팅형(ported) 척추강내 카테터를 사용하여 경추 수준 1 내지 2 접합부에서 척추강내로 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE를 투여하였다. 동물에게 트렌델렌버그 자세(트렌델렌버그 자세)로 대략 6시간 간격을 두고 0.125 ㎖/분의 2.5 ㎖ 주입을 2회 투여하였다. 2회 용량을 투여하였다: 7.5e12VG/NHP(@1e11VG/뇌 그램) 및 2.75e13VG/NHP(@3.3e11VG/뇌 그램). 투여 29일 후에, 동물을 안락사시키고, 샘플을 ARSA 활성에 대해 평가하였다: 뇌에서 59개의 조직을 펀치하였고, 척수에서 7개의 조직을 펀치하였다. 뇌 및 척수에서 유의미하게 증가된 설파타제 활성이 관찰되었고, 뇌 전체적으로 펀치의 59% 및 86%는 각각 저용량 및 고용량에서 배경보다 적어도 10% 증가된 활성을 나타낸다(**도 9a**). 이는 10% 초과의 활성 증가와 함께 50% 펀치라는 본 발명자들의 목표 기준을 초과한다. 유사하게, 저용량 및 고용량으로 처리된 NHP의 척수에서 각각 설파타제 활성의 25% 및 32% 증가가 관찰되었다(**도 9b**). FLAG 항체에 대해 IHC로 처리된 NHP의 뇌에서 광범위한 ARSA 생체 분포가 관찰되었다(**FIG 9C**). 본 발명자들의 결과는 AAV.rh10-CBA-ARSA-WPRE 매개 유전자 대체가 중추 신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS)에서 광범위하고 치료적인 ARSA 수준을 달성하기 위한 실행 가능한 접근이라는 것을 나타낸다.

[0176] **실시예 10: 비인간 영장류(NHP)를 이용하는 연구 - AAV1999 또는 AAV.rh10을 포함하는 입자의 투여 후 비교 이식유전자 발현 수준**

[0177] AAVrh10 및 AAV1999(서열번호 12를 갖는 VP1; 서열번호 13을 갖는 VP2; 및 서열번호 14를 갖는 VP3)에 대해 혈청음성인 사이노몰거스 원숭이(수컷, 마우리티안(Mauritian) 2세, 2 내지 3 kg)에게 요부에 삽입된 포팅형 척추강내 카테터를 사용하여 경추 수준 1 내지 2 접합부에서 척추강내로 투여하였다. 동물에게 트렌델렌버그 자세로 대략 6시간 간격을 두고 0.125 ㎖/분의 2.5 ㎖ 주입을 2회 투여하였다. 1 용량의 AAV1999/rh10/Myo-CBA-eGFP를 2.75e13VG/NHP(@3.3e11VG/뇌 그램)로 투여하였다. 투여 2주 후에, 동물을 안락사시키고, 샘플을 녹색 형광 단백질 (GFP) 발현에 대해 ELISA에 의해 평가하였다.

[0178] 16개의 상이한 뇌 영역을 나타내는 총 41개의 뇌 펀치(회색질)는 AAVrh.10에 비해 AAV1999로부터 유의미하게 더 높은 GFP 발현을 나타냈다(**도 10a**). 모든 샘플에 걸쳐, AAV1999-처리 NHP의 뇌에서의 GFP 발현이 AAVrh.10-처리 NHP에 비해 93% 내지 123% 더 높았다(**도 10b**). 이는 히트맵에 의해 입증되며, 여기서, AAV1999 처리된 NHP의 41개의 펀치 중 38개(3개의 NHP에 걸쳐 평균을 냄)는 AAVrh10 처리 NHP에 비해 GFP 발현의 최소 10% 증가를 나타낸다(**도 11**). eGFP에서 항체로 염색된 대표적인 매칭 뇌 절편이 AAV1999 처리 NHP에서 강한 발현을 나타내며, 이는 AAVrh10에 비해 우수한 생체분포를 입증한다(**도 12**). 더 나아가, 척수 및 DRG에서, AAV1999-처리 NHP의 GFP 발현은 AAVrh.10-처리 NHP에 비해 각각 79% 및 22% 더 높았다. **도 13**은 NHP의 척수 및 DRG에서의 GFP 발현을 나타낸다. 심장 및 간에서의 AAV1999-GFP 발현이 처리된 NHP에서 AAVrh10-GFP에 비해 더 낮았다(**도 14**).

[0179] AAV1999 벡터 게놈 로드는 AAVrh.10에 비해 뇌에서 10배 더 낮고 척수에서 3배 더 낮았다(**도 15a**). 이는 GFP 발현(y-축)과 조직 벡터 게놈(x-축) 사이의 상관관계의 '좌측-이동'에서 뚜렷하고, AAV1999에 대한 상관관계에서 (적색) 좌측 이동되는데, 이는 벡터의 더 높은 단백질 발현 및 더 낮은(대략 10배) 조직 용량을 나타낸다(도 16). 더 나아가, DRG, 간, 심장, 폐 및 신장은 또한 AAVrh.10에 비해 더 낮은 AAV1999 벡터 게놈을 나타낸다(**도 15b**). 비장은 AAVrh.10에 비해 더 높은 AAV1999 벡터 게놈을 나타내는 유일한 시험 조직이다(**도 15b**). 이들 결과는 AAV1999가 AAVrh.10보다 우수하고 더 낮은 용량에서 더 광범위한 생체분포 및 더 높은 이식유전자 발현을

제공한다는 것을 나타낸다.

[0180] **실시예 11: AAV1999-ARSA를 사용하는 신경병증 전 Arsa KO 마우스 모델에서의 장기간 약리학, 효능 및 지속성 연구**

[0181] 본 연구는 *Arsa* KO 마우스 모델에서 AAV1999-ARSA의 장기간 약리학 및 효능을 평가하도록 설계되었다. 연구 설계를 표 2에 요약한다. 2개월령 *Arsa* KO 마우스에 마우스당 1.6e11 VG(3.3e11 VG/gm 뇌 중량)로 AAV1999-ARSA(LOT# VP091321)를 투여하였다(양쪽 ICV 주사; 반구당 4uL). 대조군으로서, 연령-매칭 WT 및 *Arsa* KO 마우스에 제형 완충제를 투여하였다. 마우스를 투여 13개월 후에 안락사시키고, 샘플을 수집하였다.

표 2

***Arsa* KO 마우스(2개월 내지 15개월)에서의 장기간 약리학, 효능 및 지속성 연구**

[0182]

그룹	수/성별	유전자형	시험 항목	용량	투여 요법	시점, 샘플 수집, 분석
1	12 (6M, 6F)	WT	제형 완충제	N/A	양측 ICV, 각 측면에 4ul	☑ 투여 연령: 2개월 ☑ 희사 연령: 15개월 (생애 13개월) ☑ 뇌, 척수, DRG, 좌골 신경, 간, CSF 및 혈장
2	12 (6M, 6F)	ARSA$^{-/-}$	제형 완충제	N/A		
3	12 (6M, 6F)	ARSA$^{-/-}$	AAV1999-ARSA (로트# VP091321)	1.6e11VG (3.3e11VG/그램 뇌 중량)		

[0183] AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스의 뇌 및 척수에서 강한 *hARSA* mRNA 발현이 관찰되었다(**도 18**). 설파타제 활성 분석 키트(Abcam, ab204731)를 사용하여 설파타제 활성을 측정하였다. AAV1999-ARSA를 투여한 *Arsa* KO 마우스는 뇌, 척수, DRG 및 좌골 신경에서 정상(WT와 동등한) 설파타제 활성 수준을 나타냈다(**도 19**). 처리 마우스의 간에서 WT 설파타제 활성 수준에 대한 측정 가능한 증가가 관찰되었다(**도 19**). MLD 환자에서의 설파타이드 침착은 독성 및 뉴런 사멸의 주된 유발자이다. 설파타이드의 탈아실화된 형태인 라이소-설파타이드(라이소-ST)는 모든 조직에서 축적되고, 환자에서 MLD-관련 병리의 특징적 특질이다. AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스에서, 라이소-ST 수준은 뇌 및 척수에서 정상(WT와 유사)으로 회복되었다(**도 20**). DRG, 좌골 신경 및 간에서 라이소-ST 수준의 유의미한 감소가 또한 관찰된 한편, 처리 동물로부터의 혈장 및 CSF에서 총 설파타이드 수준이 유의미하게 감소되었다(**도 20**). 뇌 및 척수에서의 설파타이드 제거 결과, AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스는 뇌 및 척수에서 신경염증 마커(*Gfap* 및 *Aif1*) 및 *Lamp1* 발현(라이소솜 건강의 마커)의 유의미한 개선을 나타냈다(**도 21**). 더 나아가, 완충제 처리 *Arsa* KO 마우스에 비해 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO에서 혈장 Nf-L 수준의 유의미한 감소가 관찰되었다(**도 22**).

[0184] MLD 환자는 종종 청력 장애가 있다. 청력 뇌간 반응(ABR) 검사는 내이(달팽이관) 및 청각을 위한 중심 경로에 관한 기능적 정보를 제공한다. ABR은 소리 자극에 대해 달팽이 신경절 뉴런과 중추 청각 경로의 핵 모두의 전기적 반응을 반영한다(Zhou et al., 2006; Burkard et al., 2007). ABR은 마취된 동물의 두피에 배치된 전극을 통해 기록한다. ABR 역치는 식별 가능한 전기 응답 파동을 생성할 수 있는 가장 낮은 음압 수준(SPL)을 지칭한다. *Arsa* KO는 AAV1999-ARSA로 처리 시 반전된 시간에 따른 청각의 점진적 악화를 나타낸다(**도 23**). 표현형의 부분적 역전은 투여 4개월(투여 후 시험한 가장 빠른 시간) 후만큼 일찍 관찰된다(**도 23**).

[0185] 모든 *Arsa* KO 마우스의 뇌에서 보통 뇌간 및/또는 소뇌에서 공포형성 및 신경퇴행이 관찰되었다. 처리 마우스에서, 10마리의 마우스 중 4마리에서만 조직학적 변화가 검출되었고, *Arsa* KO 마우스보다 중증도는 더 낮았다(**도 24a**). 모든 *Arsa* KO 마우스는 척수에서 최소 중증도의 공포형성을 나타냈지만, WT 마우스 또는 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스에서 변화가 검출되지 않았다(**도 24b**). 최종적으로, 임의의 그룹의 DRG에서 어떤 병리학적 변화도 검출되지 않았다(KO+AAV 그룹의 10마리 동물 중 1마리는 제외)(**도 24c**). 따라서, AAV1999-ARSA에 의한 *Arsa* KO 마우스의 치료는 뇌에서 MLD-관련 병리를 유의미하게 최소화하고/하거나 예방하였고, 척수에서 MLD-연관 병리를 예방하였다.

[0186] **실시예 12: AAV1999를 사용한 초기-신경병증 ARSA KO 마우스 모델에서의 종단적 약리학, 효능 및 지속성 연구**

[0187] 6개월의 기간에 걸쳐 *Arsa* KO 모델에서 MLD-연관 병리 및 생화학적 표현형의 표적 관여 및 반전을 평가하기 위해 본 연구를 설계하였다. 초기-신경병증 단계(투여 시 6개월)를 표적 환자 집단과 가장 관련되는 것으로 선택

하였다. 연구 설계를 표 3에 요약한다. 6개월령 *Arsa* KO 마우스에 AAV1999-ARSA(LOT# VP091321)를 마우스당 5e10 VG(1e11VG/gm 뇌 중량)의 용량으로 투여하였다(양쪽 ICV 주사; 반구당 4uL). 대조군 연령-매칭 WT 및 *Arsa* KO 마우스에 제형 완충제를 투여하였다. 마우스를 투여 1, 2, 3 및 6개월 후에 안락사시키고, 샘플을 수집하였다.

표 3

***Arsa* KO 마우스에서의 종간 약리학, 효능 및 지속성 연구**

[0188]

그룹	수 및 성별	유전자형	시험 항목	용량	투여 요법	시점, 샘플 수집, 분석
1	32 (16M, 16F)	WT	제형 완충제	N/A	양측 ICV, 각 측면에 4ul	☑ 투여 연령: 6개월 ☑ 희사 연령: 7개월(생애 1개월), 8개월(생애 2개월), 9개월(생애 3개월), 12개월(생애 6개월) ☑ 뇌, 척수, DRG, 좌골 신경, 간, CSF 및 혈장
2	32 (16M, 16F)	*Arsa*$^{-/-}$	제형 완충제	N/A		
3	32 (16M, 16F)	*Arsa*$^{-/-}$	AAV1999-ARSA(로트 # VP091321)	5e10VG (1e11VG/그램 뇌 중량)		

[0189] 뇌에서의 AAV1999-ARSA 벡터 게놈 노출은 투여 후 6개월 기간에 걸쳐 일관되게 유지되었다(**도 25a**). 이는 시간에 따라 지속적인 ARSA-매개 설파타제 활성(**도 25b**)과 투여 후 1개월까지 달성된 피크 설파타제 활성(**도 25c**)으로 해석된다. 각 시점에, 처리한 마우스는 라이소-, C16- 및 C18-설파타이드에서의 유의미한 감소를 나타냈다(**도 26a 내지 도 26c**). 중요하게는, 제거는 점진적이었으며, 설파타이드 수준(특히 라이소-ST)은 투여 6개월까지 정상으로 회복되었다(**도 26 D 내지 도 26f**). 더 나아가, CSF 및 혈장 중의 총 설파타이드 수준은 AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스에서 유의미하게 감소되었다(**도 27**). 최종적으로, 혈장 Nf-L 수준의 초기 증가는 KO+FB 그룹과 비교하여 AAV1999-ARSA의 투여 후 6개월까지 감소된다(**도 28**).

[0190] *Arsa* KO 마우스의 뇌에서의 신경 및 호중구 변화는 뇌간 및/또는 소뇌핵에서 관찰되었다. 특히, 이러한 변화의 발생률 및 중증도 감소는 AAV1999-ARSA로 처리한 *Arsa* KO 마우스에서 투여 후 2개월만에 관찰되었다(**도 29a 내지 도 29b**). 일부 AAV1999-ARSA 처리 마우스의 뇌(보통 해마 근처)는 병소, 다병소, 혈관주위, 최소 중증도의 단핵 세포의 침윤물이 있었다(**도 29c**). 또한 그룹당 1 내지 2마리 동물에서 주로 CA3 영역 뉴런의 최소 변성/괴사가 있었다(**도 29d**).

[0191] 일부 AAV1999-ARSA 처리 마우스의 등쪽 뿌리 신경절은 보통 최소 중증도의 교질 세포 및/또는 단핵 세포의 세포충실도(cellularity)의 병소 또는 다병소 증가를 가졌고(**도 30a**), 일부 처리된 *Arsa* KO 마우스는 신경 축삭돌기의 최소 변성을 나타낸다(**도 30b 내지 도 30c**). 모든 그룹의 동물의 모든 그룹의 척수에서 현미경 소견이 관찰되었고, 무작위 또는 우연한 것으로 여겨졌다(**도 30d**). 대부분의 *Arsa* KO 마우스는 좌골 신경에서의 조직학적 변화(매우 최소 또는 최소 축삭 변성)을 나타냈고, AAV1999-ARSA 처리 *Arsa* KO 마우스에서 발생률 및 중증도는 때때로 최소/경증 또는 경증으로 증가되었다(**도 30e**). WT 마우스의 좌골 신경은 또한 드물고, 매우 최소한의, 부수적 축삭 변성의 배경을 가졌다(**도 30e**). 간에서는 시험-항목 특이적 소견이 발견되지 않았다.

[0192] 종합하면, 이들 데이터는 *Arsa* KO 마우스에서 AAV1999-ARSA 매개 유전자 대체가 잘 용인되고, MLD-관련 표현형을 수컷과 암컷 마우스 모두에서 동일한 정도로 반전시켰다는 것을 입증한다.

[0193] **실시예 13: AAV1999-ARSA를 평가하는 NHP 약리학 및 용량 범위 소견 연구**

[0194] 간략히 말해서, AAV1999 중화 항체에 대해 혈청 음성인 목적 사육, 미경험, 수컷/암컷 사이노몰거스(캄보디아 2 내지 3세, 2.6 내지 3.1 kg)ㄴ에NHP를 단일 직접 거대 수조(ICM) 주입으로 투여하였다. 동물을 투여 동안 트렌델렌버그 자세로 배치한다. 투여 패러다임은 AAV1999-ARSA (LOT# VP050322)를 0.125 ㎖/분으로 단일 2.5 ㎖ 주입한 후에, 제형 완충제에 의한 250 ㎕ 플러시가 이어졌다. 투여 5주 후에, 동물을 안락사시키고, 안전성 평가와 함께 벡터 생체분포(dPCR) 및 *hARSA* mRNA(RTdPCR)에 대해 샘플을 평가하였다. 샘플은 19개의 별개의 회색질 영역과 7개의 별개의 백질 영역, 인접한 DRG가 있는 척수의 8개 분절, 말초 신경 및 내장 기관을 나타내는 뇌로부터의 64개의 펀치를 나타낸다. 연구 설계를 표 4에 기재한다.

표 4

연구 CRL.2021-5613: NHP 용량 범위 결정 연구

그룹	시험 항목	용량/gm 뇌 중량	용량/동물	투여 요법	동물 수	시점, 샘플 수집, 분석
1	AAV1999-ARSA	1e10 VG	7.5e11 VG	RoA: 트렌델렌버그 자세로 배치된 동물의 ICM 투여 매개변수: 250ul 플러시로 0.125 mL/분에서 2.5ml	5 (M/F)	생애: 35일 괴사 시 뇌, 척수, DRG, 말초 신경, 내장 기관
2		3.3e10 VG	2.5e12 VG		5 (M/F)	
3		1e11 VG	7.5e12 VG		5 (M/F)	
4		3.3e11 VG	2.5e13 VG		5 (M/F)	CSF(연구 전 및 괴사 시)
5	제형 완충제	n/a	n/a		3 (M/F)	혈장: 연구 전, 투여 후 일수: 2, 4, 7, 14 및 괴사 시 신경학적/행동 평가 (투여 전, 투여 후 7일 및 5주)

[0195]

[0196] 회색질(19개의 고유한 뇌 영역) 및 백질 영역(7개의 고유한 뇌 영역) 모두에서 ICM 투여를 통해 NHP 뇌에서 AAV1999-ARSA 벡터 생체분포에서의 용량 의존적 증가가 관찰되었다(**도 31**). AAV1999-ARSA 처리는 또한 두 가지 최고 용량(7.5e12VG (1e11VG/gm 뇌 중량) 및 2.5e13VG(3.3e11VG/gm 뇌 중량))에서 hARSA mRNA(**도 32**) 및 단백질(**도 33**) 수준의 광범위한 용량-의존적 증가를 초래하였다. 척수 문측-미골 축을 따라, DRG 및 척수에서 균일한, 용량-의존적 벡터 생체분포 및 hARSA 발현이 관찰되었다(**도 34**). 내장 기관 중에서, 간, 비장 및 경부 림프절은 용량-의존적 벡터 생체분포 증가를 나타낸다(**도 35**).

[0197] AAV1999-ARSA의 투여가 NHP 뇌에서 의미있는 인간 ARSA 발현을 야기하는지의 여부를 연구하기 위해, 본 발명자들은 AAV-유래 인간 ARSA 단백질 수준을 평가하였고, 1) 내인성 사이노몰거스 cyARSA 단백질(동일한 샘플 내에서 측정된 19개의 뇌 영역에서의 hARSA/cyARSA) 및 2) 3세와 8세 사이의 7명의 건강한 기관-공여자의 뇌에서(12개의 뇌 영역에서) 측정된 인간 ARSA 단백질과 비교하였다. 1e11VG/gm 및 3.3e11VG/gm 뇌 중량의 용량에서, 뇌 전체의 평균 인간 ARSA 단백질 수준은 천연 cyARSA의 대략 63% 및 대략 546%였다(**도 36**). 또한, 1e11VG/gm 및 3.3e11VG/gm 뇌 중량의 용량에서, 뇌 전체의 평균 인간 ARSA 단백질 수준은 건강한 대조군 기관-공여자로부터의 인간 ARSA 단백질 수준의 대략 51% 및 대략 416%였다(**도 37**). 따라서, NHP에서 AAV1999-ARSA 처리는 1e11 및 3.3e11VG/gm 뇌 중량으로 CNS에서 치료적으로 의미있는 ARSA 단백질 발현을 초래한다.

[0198] 투여 전 검사에 비해 투여 그룹에서 투여 후 1주차 또는 5주차에 NHP에서 임상 징후(기능 또는 행동 결함)는 관찰되지 않았다(**도 38**). CM 내 주입은 잘 용인되었고; 예상한 바와 같이, ICM 절차는 CSF Nf-L 수준의 유의미한 증가를 설명했으며, 제형 완충제 처리 NHP에 비해 AAV1999-ARSA 처리 NHP에서 추가 증가가 관찰되었다(**도 39a**). 그러나, 용량 의존적 증가는 관찰되지 않았다(**도 39a**). 임의의 용량에 걸쳐 AAV1999-ARSA로 처리한 NHP에서 혈장 사이토카인 농도의 유의미한 변화는 관찰되지 않았고(**도 39b**), IFN-γ ELISpot에 의한 2회의 고용량에서 AAV1999-ARSA로 처리한 NHP에서 AAV1999 캡시드 또는 hARSA 단백질에 대한 세포-매개 면역 반응은 언급되지 않았다(**도 39c**). 더 나아가, 부검 시 어떤 동물에서도 시험 항목-관련 총체적 발견은 언급되지 않았다.

[0199] 뇌척수액 변화는 대부분의 동물에서 1e10 VG/gm 뇌 중량으로부터 유핵 세포 수(주로 단핵 세포)의 최소, 용량과 관련되지 않은 증가로 이루어졌다. 또한, 알부민 및/또는 총 단백질은 대부분의 동물에서 벡터 투여 5주 후에 3.3e10 VG/gm 뇌 중량 이상으로 증가되었다. 3.3e10 또는 3.3e11 VG/gm 뇌 중량인 소수의 개개 동물은 형태학적으로 신경 물질과 양립 가능한 호염기성 내지 호산성, 과립 물질의 양이 가변적이었다. 이러한 변화는 중추 신경계로부터의 다양한 절편에서 나타나는 신경 퇴행 및 단핵 침윤과 상관관계가 있었다.

[0200] 혈액학적 변화는 7일차에 대부분의 남성에서 1e10 VG/gm 이상의 뇌 중량, 소수의 산발적 여성에서 1e11 VG/gm 뇌 중량으로 망상적혈구 수의 일시적인 경미한 증가와 동시에 소수의 개체에서 적혈구 질량 매개변수의 최소 감소로 이루어졌다. 3.3e10 VG/gm 뇌 중량에서 일부 수컷 및 암컷에서 호중구, 림프구 및/또는 단핵구 수의 증가에 따라 부차적으로 백혈구 수가 증가하였고, 일부 동물에서 주로 3.3e11 VG/gm 뇌 중량을 투여한 수컷에서 여전히 나타난다. 응고 또는 임상 화학에서 시험-항목 관련 효과는 나타나지 않았다.

[0201] 주요 시험 항목 효과는 신경 퇴행(뇌, 요부 척수 및 DRG에 영향을 미침), 교질 세포 반응의 증가(소뇌 및 척수), 신경 섬유 변성(척수의 백질 및 말초 신경의 신경 섬유에 영향을 미침), 및 뇌(소뇌), DRG 및 척수에 영향을 미치는 단핵 세포 침윤물(혈관주위 분포 포함)을 포함하였다(**도 40 내지 도 42**). 내장 기관(심장, 간, 담낭, 비장, 췌장, 부신, 폐, 뼈, 흉골/골수, 난소, 십이지장, 고환, 부고환, 흉선, 눈, 자궁경부를 포함한 자궁, 신장)에서 어떤 용량에서도 시험 항목 관련 소견이 관찰되지 않았다. 일부 위치, 예컨대, 신경 변성(가장 높은 용량으로 소뇌, 요부 DRG에서), 교증(대뇌 피질, 소뇌(척수에는 없음))에서 일부 변화에 대해, 그리고 단색 세포 침윤에 대해(가장 높은 용량으로 대뇌 피질에서 그리고 요부 DRG에서) 가장 낮은 용량(1e10VG/gm 뇌 중량)과 가장 높은 용량(3.3e11VG/gm 뇌 중량) 사이에 용량 반응이 나타났다(**도 40 내지 도 42**).

[0202] 결론적으로, 직접 대수조 내(ICM) AAV1999-ARSA의 단일 투여는 사이노몰거스 원숭이(수컷과 암컷 둘 다)에서 1e10, 3.3e10, 1e11 및 3.3e11 VG/gm 뇌 중량의 투여 수준에서 잘 용인되었고, 1e11 및 3.3e11 VG/gm 뇌 중량이 효능있는 용량으로 여겨졌다.

[0203] 서열

ARSA 폴리펩타이드 서열

```
        10         20         30         40         50
MGAPRSLLLA LAAGLAVARP PNIVLIFADD LGYGDLGCYG HPSSTTPNLD
        60         70         80         90        100
QLAAGGLRFT DFYVPVSLCT PSRAALLTGR LPVRMGMYPG VLVPSSRGGL
       110        120        130        140        150
PLEEVTVAEV LAARGYLTGM AGKWHLGVGP EGAFLPPHQG FHRFLGIPYS
       160        170        180        190        200
HDQGPCQNLT CFPPATPCDG GCDQGLVPIP LLANLSVEAQ PPWLPGLEAR
       210        220        230        240        250
YMAFAHDLMA DAQRQDRPFF LYYASHHTHY PQFSGQSFAE RSGRGPFGDS
       260        270        280        290        300
LMELDAAVGT LMTAIGDLGL LEETLVIFTA DNGPETMRMS RGGCSGLLRC
       310        320        330        340        350
GKGTTYEGGV REPALAFWPG HIAPGVTHEL ASSLDLLPTL AALAGAPLPN
       360        370        380        390        400
VTLDGFDLSP LLLGTGKSPR QSLFFYPSYP DEVRGVFAVR TGKYKAHFFT
       410        420        430        440        450
QGSAHSDTTA DPACHASSSL TAHEPPLLYD LSKDPGENYN LLGGVAGATP
       460        470        480        490        500
EVLQALKQLQ LLKAQLDAAV TFGPSQVARG EDPALQICCH PGCTPRPACC

HCPDPHA  (서열번호 1)
```

코돈 최적화된 **ARSA DNA** 서열(인간)

```
ATGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCT
AACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGC
ACCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTC
TGTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCG
TGCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCC
AGAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCT
CCTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGA
CCTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
```

[0204]

GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGA （서열번호 2）

rAAV 패키징을 위한 플라스미드의 전체 DNA 서열; ARSA에 대한 암호화 서열은 밑줄표시됨

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCA
ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGA
GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATT
TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT
CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGG
GCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGG
CTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
CGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCG
GCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC
CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGT
GGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGG
CGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGG
TGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCT
CCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGG
TTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCT
ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCACCA
TGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTA

[0205]

[0206]

ACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCA
CCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCT
GTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGT
GCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCA
GAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTC
CTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGAC
CTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT
TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTG
GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC
CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAG
ACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAATCGCGACGGCCGACGTCTTT
GTTACAACTTACTATATATATGCACACATATATATATATTTGGGTATATTGGGGGGGTTCTAATTTAAGAA
ATGCATAATTGGCTATAGACAGACAGTTGTCAGAACTTGGCAATGGGTACGTGCAGGTTCATTATACCA
AGTCTACTTGTAGTTGTTCAAAATGTATCATAATACAAGGCCGGGCGAGGTCGTCACGCCTGTAATCCCA
GCATTTTGGGAGGCTAAGGCAGGAGGATTGCTTGAGGTCAGGAGTTTGTGACCAGCCTGGGCAACAGA
GCAAGACCCTGTCTCCAAAAAGAAAAAAAATAATTTTTTACAAAATAAAAACAAAATGTATCATCAGACG
AAATTAAATAAGAGGCAATTCATTGTAATGACAACTTTTCCCAGCTTGACATTTAACAAAAAGTCTAAGT
CCTCTTAATTCATATTTAATGATCAAATATCAAATACTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTC
TCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCGATCCTGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTT
CACGCCATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATTACAGACATGCGCCACCACGCCCGGCTAAT

[0207]

TTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCTCCATGTTGGTCAGGCTGGTCTTGAATTTCCCACCTCAGGTGA
TCTGCCTGCCTCAGCCTCACAAAGCAGTAGCTGGGACTACAGGCACCCACCACCACACTTGGTTAATTCT
TTTGTATTTTTTTTGTAAAGACGGGATTTCACCATGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGATCTCATGA
TCCGCCCGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGCCACCCCGCCCGGCCATCAAATAC
TAATTCTTAAATGGTAAGGACCCACTATTCAGAACCTGTATCCTTATCACTAATATGCAAATATTTATTGA
ATACTTACTATGTCATGCATACTAGAGAGAGTTAGATAAATTTGATACAGCTACCCTCACAGAACTTACA
GTGTAATAGATGGCATGACATGTACATGAGTAACTGTGAACAGTGTTAAATTGCTATTTAAAAAAAAAG
ACGGCTGGGCGCTGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCAAGTTGATCGCTCG
AGGTCAAGAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACGTGGTAAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAAA
AATTAGCCAGGCATGGTGGCACAGGCCTGTAATCCCAGCTACTAGGGAGGCTGAGACATGGAGAACTG
CTTGAATCCAGGAGGCAGAGGTTACAGTGAGCCGAGATCATACCACTACACTCCAGCCTGAGTGACAGA
GCGAGACTCCTGTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATACAGGTTAAGTGTTATGGTAGTTGAAGAG
AGAACTCAAACTCTGTCTCAGAAGCCTCACTTGCATGTGGACCACTGATATGAAATAATATAAATAGGTA
TAATTCAATAAATAGGAACTTCAGTTTTAATCATCCCAAACACCAAAACTTCCTATCAAACAGGTCCAATA
AACTCAATCTCTATAAGAGCTAGACAGAAATCTACTTGGTGGCCTATAATCTTATTAGCCCTTACTTGTCC
CATCTGATATTAATTAACCCCATCTAATATGGATTAGTTAACAATCCAGTGGCTGCTTTGACAGGAACAG
TTGGAGAGAGTTGGGGATTGCAACATATTCAATTATACAAAAATGCATTCAGCATCTACCTTGATTAAGG
CAGTGTGCAACAGAATTTGCAGGAGAGTAAAAGAATGATTATAAATTTACAACCCTTAAAGAGCTATAG
CTGGGCGTGGTGGCTCATGCCTGTAAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAG
GCCAGAAGTTCAAGACCAGCCTAGCCAACATGGCGAAACCCTGTCTCTACAAAAAATACAAAAATTAGC
CGGGTGTGGTGGCACGTGCCTGTAGTCCCAGTTACTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACC
TAGGAGGTGGAGGCTGCAGTGAGCCGAGATTGTGCCACTGCACTCCACTTCAGCCTGGGCGACAAGAG
CAAGACTCCGTCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGCTAAAATCTAGTGGGAAAGGCATATATACAT
ACAACTAACTGTATAGCATAATAAAGCTCATAATCTGTAACAAAATCTAATTCGACAAGCCCAGAAACTT
GTGATTTACCAAAAACAGTTATATATACACAAAAAGTAAACCTAGAACCCAAAGTTACCCAGCACCAATG
ATTCTCTCCCTAAGCAGTATCAAGTTTAAAGCAGTGATTACATTCTACTGCCTAGATTGTAAACTGAGTAA
AGGAGACCAGCACCTTTCTGCTACTGAACTAGCACAGCCGTGTAAACCAACAAGGCAATGGCAGTGCCC
AACTTTCTGTATGAATATAAGTTACATCTGTTTTATTATTTGTGACTTGGTGTTGCATGTGGTTATTATCAA
CACCTTCTGAAAGAACAACTACCTGCTCAGGCTGCCATAACAAAATACCACAGACTGAGTGACTTAACAG
AAACTTATTTCTCACAGTTTTGGAGGCTGGGAAGTCCAAAATTAAGCTAACTGCAAGGTAGGTTTCAATC
TCAGGCCTCTTCTTTGGCTTGAAGGTCTTCTAACTGTGTGCTCACATGACCTCTTCTAACAAGCTCTCTGG
TGTCTCTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTGAGACAGAGTCTCACTCTGTCACCCAGGCTGGAGTACAGTGGCA
CAATCTGGGCTCACTGCAACCTCCAACTCCCGGGTTCAAGTGATTCTCATGCCTCACCCTCCCGAGTAGCT
TGGATGACAGGAGCCCGCTACCACACCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGTGTTTCACTACA
TTGGCCAGGCTGGTCTCAAACTCCTGACCTCGTGATCCACCCACCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTA
CAGGTGTGAGCCACTGCGCCCGTCCTGGTGTCTTTTCATATAAGGGCACTAATCCAATCAGACCTGGGCC
CAACCCTCCCGACTTCTTCTAACTGTAATTACCTTCCAAAGGCCCTGTCTCCAAATACCATCACACTGGGG
GTTAGGACTTCAAAAAAGGTATGGGGGGGGTGTGGGAGGACATAAATGCTCAGTCCATAACAAGCACC
CAACATAAAAATGGCTAGAACAGATCACAAAAAAAAGGTCCTGTATGGCTTTGGGGAAGGGCTCAACC
CCAAAATATCTGAAAGCTCTGGAGGGGCCTAGAAGTGGTAAATGAATGAAAACGTGGTTACTCTCCCGA
TCTGCCTTTCCCAAATATGGCCATTCTTGGCTGAATCAGAAATCAAAGGACAGGTTATTAATTACTAGCTC
TAAGTTACTTACCATTTGCTGAGACAGTTCAGAAATCTGACTGCATCTCCTCAGGGATCTAGAACACAGT
TCTCAAATTCTAACTTACTTGTGATATACTTGTGAATGATAAAAATCGCTACAGGTACTTTTATTAATCTG
AAAGAGTATTGAGAAATTACCTTTCATTCTGACTTTTGTCTGGAATGAAAATCAATACTTTTGCTATATTC

CATTACTGAAATAATTTTACTTTCCAGTAAAACTGGCATTATAATTTTTTTTAATTTTTAAAACTTCATAATT
TTTTGCCAGACTGACCCATGTAAACATACAAATTACTAATAATTATGCACGTCACATCTGTAATAATGGCC
TTCATGTAAACATTTTTGTGGTTTACACATAAAATCTCTAATTACAAAGCTATATTATCTAAAATTACAGTA
AGCAAGAAAATTAATCCAAGCTAAGACAATACTTGCAACATCAATTCATCATCTGTGACAAGGACTGCTT
AAGTCTCTTTGTGGTTGACGTCATTAATTAACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGT
CGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAACATGGTCATAGCTGTTTCCTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGC
TTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGCAAAAGGC
CAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGAC
GAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT
CGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAG
AACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAA
GGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAG
GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA
ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
TCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGAACCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCA
GCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAG
TCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTACAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATC
AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTC
AGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCG
ACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCT
CATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG
TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCC
TTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATAT
TTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAA
TCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGGCCGCTACAGGGCGCTCCCATTCGCCA
TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGTTTCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAA
AGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAA
CGACGGCCAGTGAGCGCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCT
AGGCGCGCCAACGCGT (서열번호 3)

밑줄 표시, 코돈 최적화된 ARSA DNA 서열(인간)

[0208]

5' AAV2 ITR DNA 서열

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCT (서열번호 4)

플립 배향의 **3' AAV2 ITR DNA 서열**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGG
CAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGG
AGTGGCCAA (서열번호 5)

CMV 인핸서 요소 DNA 서열 (GenBank: K03104.1)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
GTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACG
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTAC
ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG (서열번호 6)

닭-액틴 프로모터 **DNA 서열**

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTAT
TTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC
GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG
CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGG
CGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCC (서열번호 7)

WPRE 요소 DNA 서열

TTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACG
CTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCC
TTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGAC
TTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG
GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTGGCTGCTCG
CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA
CCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTC
GGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTG (서열번호 8)

[0209]

AAV9 캡시드 아미노산 서열 (VP1)

```
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
```

[0210]

```
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
```

[0211]

```
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
```

[0212]

```
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
```

(서열번호 9)

표적화 펩타이드 아미노산 서열

KGGGFHG (서열번호 10)

링커에 측접된 표적화 펩타이드-아미노산 서열

AAAKGGGFHGAS (서열번호 11)

AAV1999 캡시드 아미노산 서열 (VP1)

```
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
```

[0213]

```
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
```

[0214]

```
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
```

[0215]

```
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 Ala Ala Lys
            580                 585                 590

Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
        595                 600                 605

Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
    610                 615                 620

Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
625                 630                 635                 640

Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
                645                 650                 655

Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
            660                 665                 670

Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
        675                 680                 685

Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
    690                 695                 700

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
705                 710                 715                 720

Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
                725                 730                 735

Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu    (서열번호 12)
                740                 745
```

[0216]

AAV1999 캡시드 아미노산 서열 (VP2)

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (서열번호 13)

AAV1999 캡시드 아미노산 서열 (VP3)

Met Ala Ser Gly Gly Gly
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

[0217]

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Ala Ala **Lys**
Gly Gly Gly Phe His Gly Ala Ser Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val
Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn
Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro
Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr
Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser
Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser
Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro
Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu (서열번호 14)

벡터의 전체 DNA 서열; ARSA에 대한 암호화 서열은 밑줄표시됨

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCG
ACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG
GGGTTCCTTACGTACAATTGGGATCCCGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCA
ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT
AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT
GTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAG
TACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGA
GGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATT
TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT
CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGG
GCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGG
CTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
CGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGC
CCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCG
GCTCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAGTGTG
CGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGG
CTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAACCC

[0218]

CCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGT
GGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC
GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGG
CGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
AATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGCGAAGCGG
TGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCCGTCCCCTTCT
CCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGG
TTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTCATGCCTTCTTCTTTTTCCT
ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCTACGTACCACCA
TGAGCATGGGAGCCCCTAGATCTCTGCTGCTGGCTCTTGCTGCTGGACTGGCTGTGGCCAGACCTCCTA
ACATCGTGCTGATCTTCGCCGACGATCTCGGCTATGGCGATCTGGGCTGTTACGGACACCCTAGCAGCA
CCACACCTAACCTGGATCAACTGGCTGCCGGCGGACTGAGATTCACCGATTTCTACGTGCCCGTGTCTCT
GTGCACACCTAGTAGAGCTGCTCTGCTGACAGGCAGACTGCCAGTGCGGATGGGAATGTATCCTGGCGT
GCTGGTTCCTAGCAGTAGAGGCGGACTGCCTCTGGAAGAAGTGACAGTTGCTGAAGTGCTGGCCGCCA
GAGGCTATCTGACTGGAATGGCCGGAAAATGGCACCTCGGAGTTGGACCTGAAGGCGCTTTTCTGCCTC
CTCACCAGGGCTTCCACAGATTTCTGGGCATCCCTTACAGCCACGATCAGGGCCCTTGCCAGAACCTGAC
CTGCTTTCCTCCTGCCACACCTTGTGATGGCGGCTGTGATCAGGGACTCGTGCCTATTCCTCTGCTGGCC
AATCTGAGCGTGGAAGCTCAACCTCCTTGGCTGCCTGGCCTGGAAGCCAGATATATGGCCTTCGCTCAC
GACCTGATGGCCGACGCTCAGAGACAGGACAGACCATTCTTCCTGTACTACGCCAGCCACCACACACAC
TACCCTCAGTTCTCTGGCCAGTCCTTCGCCGAGAGATCTGGCAGAGGCCCTTTTGGCGATAGCCTGATGG
AACTGGATGCCGCCGTGGGAACACTGATGACAGCCATTGGAGATCTGGGCCTGCTGGAAGAGACACTG
GTCATCTTCACCGCCGACAACGGCCCCGAGACAATGAGAATGAGCAGAGGCGGCTGTAGCGGCCTGCT
GAGATGTGGCAAGGGAACAACATACGAAGGCGGCGTCAGAGAGCCTGCTCTGGCTTTTTGGCCTGGAC
ATATTGCCCCTGGCGTGACACACGAACTGGCCTCTTCTCTGGATCTGCTGCCTACACTGGCTGCTTTGGC
TGGCGCTCCTCTGCCTAATGTGACCCTGGATGGCTTCGATCTGTCTCCACTGCTGCTCGGAACAGGCAAG
AGCCCTAGACAGAGCCTGTTCTTCTACCCTAGCTACCCCGATGAAGTGCGGGGAGTGTTTGCCGTGCGG
ACAGGCAAGTACAAGGCCCACTTTTTTACCCAAGGCAGCGCCCACAGCGATACCACAGCTGATCCTGCTT
GTCACGCCTCTAGCAGCCTGACAGCTCATGAACCACCTCTGCTGTACGACCTGTCTAAGGACCCCGGCGA
GAACTATAATCTGCTTGGCGGAGTTGCCGGCGCTACACCTGAAGTTCTGCAGGCTCTGAAACAGCTCCA
GCTGCTGAAAGCCCAGCTGGACGCTGCTGTGACATTTGGACCTTCTCAGGTGGCAAGAGGCGAGGACC
CTGCTCTGCAGATTTGTTGTCACCCTGGCTGTACCCCTAGACCTGCCTGCTGTCACTGTCCTGATCCTCAC
GCTTGAGATTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTC
CTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTT
TCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG
CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTT
TCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCTTG
GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC

[0219]

CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAG
ACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGATCCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG
GGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTCGAAATTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC
TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG
TCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA (서열번호 16)

[0220]

밑줄 표시, 코돈 최적화된 ARSA DNA 서열(인간)

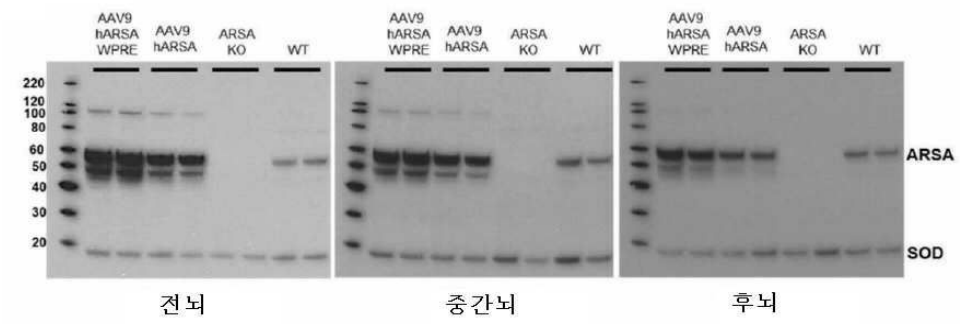
도면

도면1a

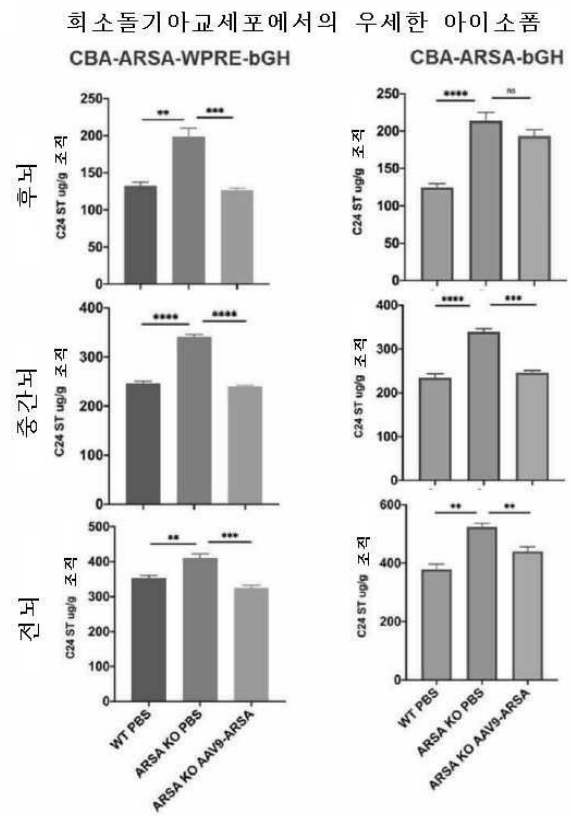
그룹	처리
1	ARSA$^{-/-}$ + ssAAV9-CBA-hARSA-WPRE-bGH
2	ARSA$^{-/-}$ + ssAAV9-CBA-hARSA-bGH
3	ARSA$^{-/-}$ + PBS



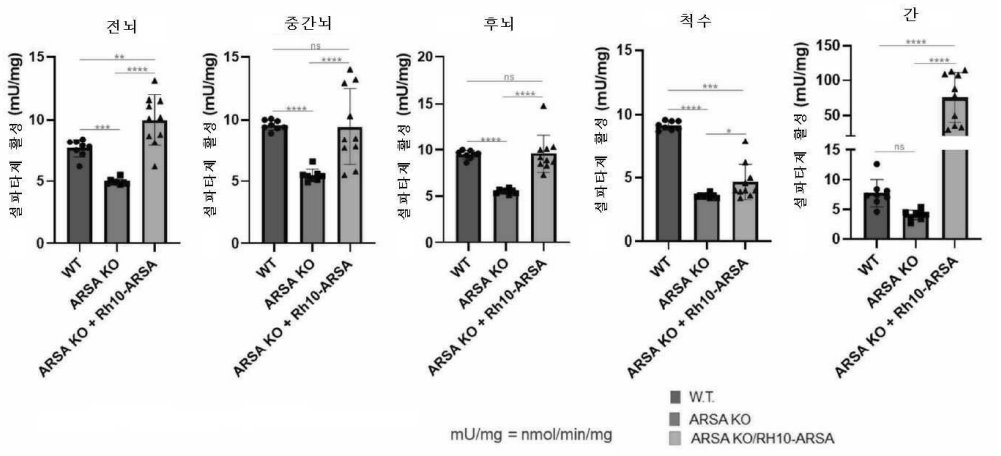
도면1b



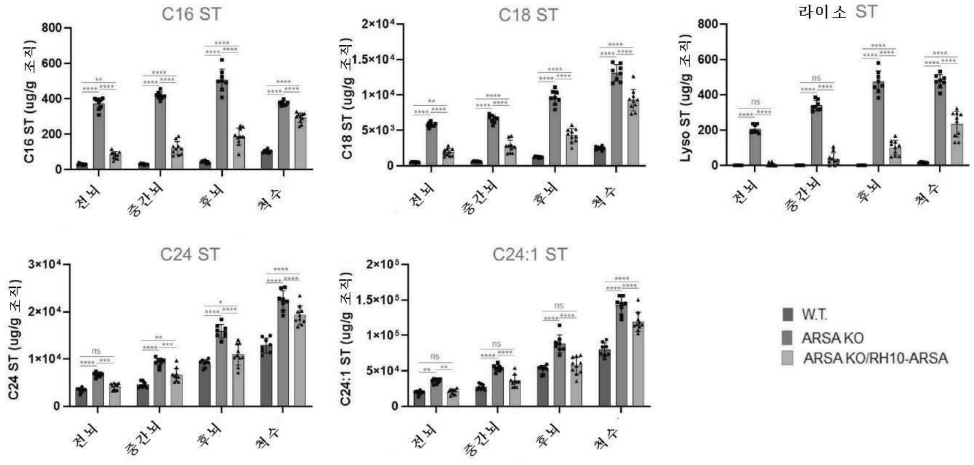
도면1c



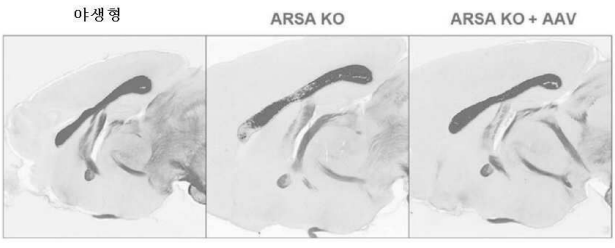
도면2

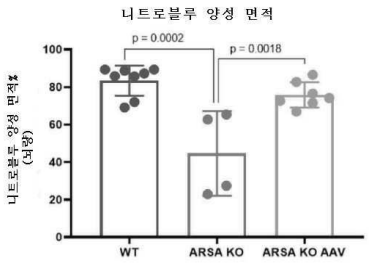


도면3



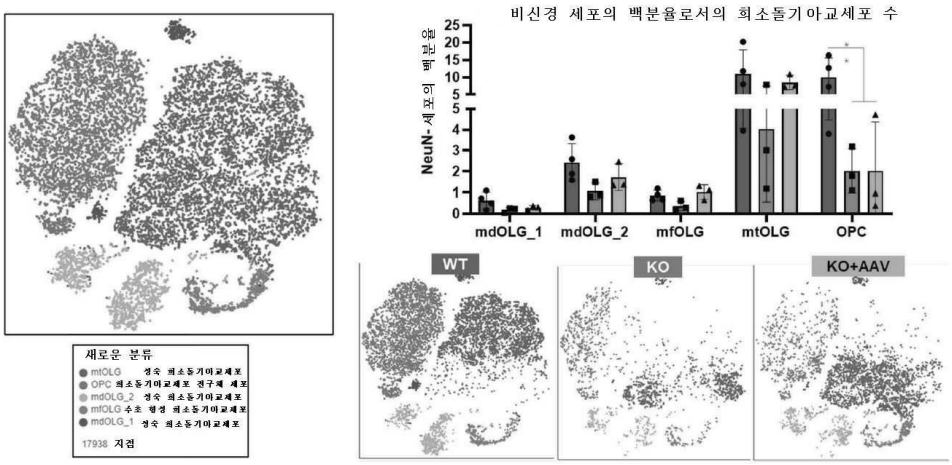
도면4



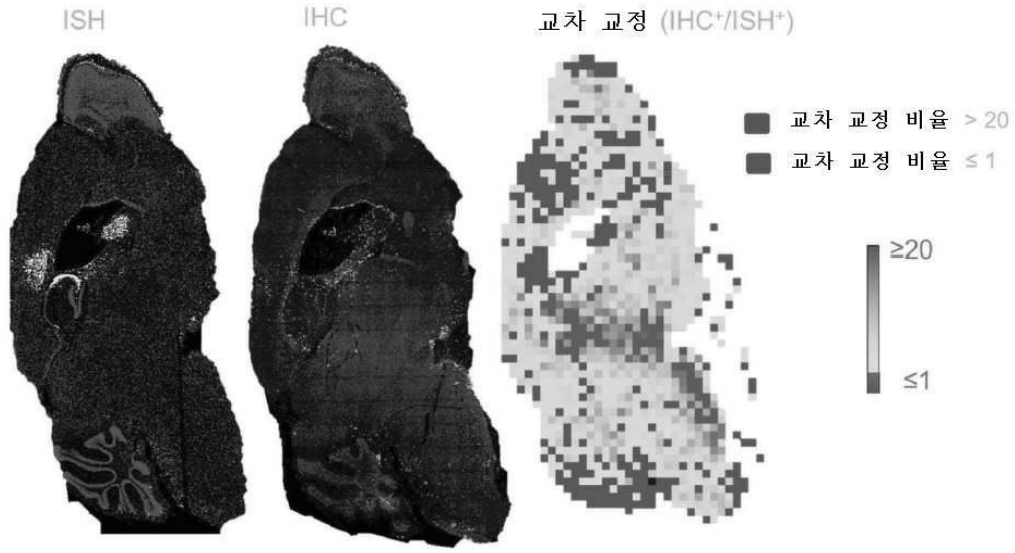


각각의 속이 찬 원은 한 마리의 마우스를 나타냄.

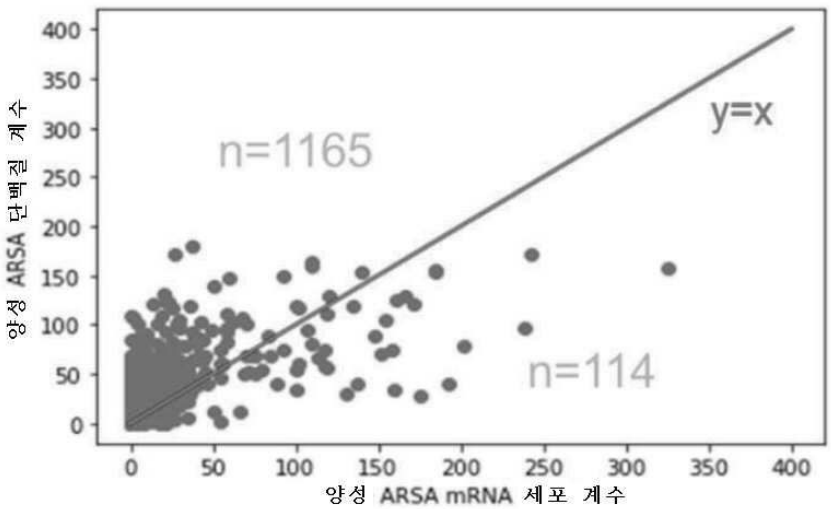
도면5



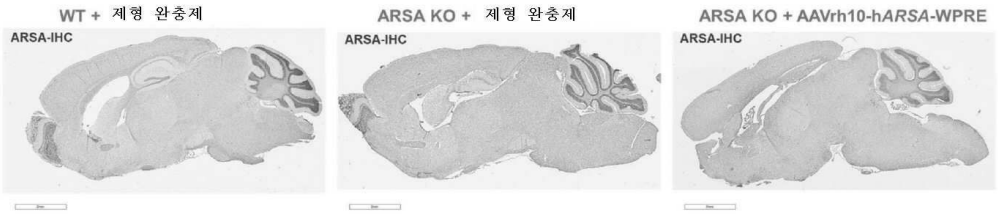
도면6a



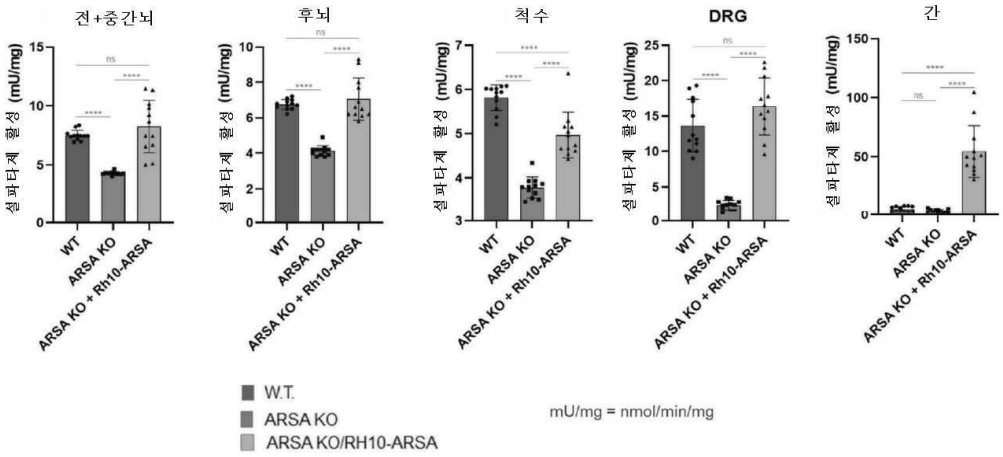
도면6b



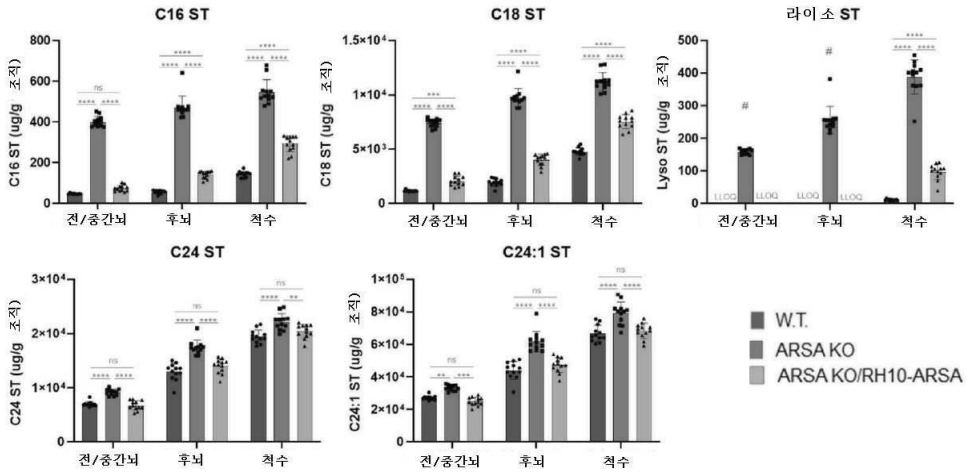
도면7a



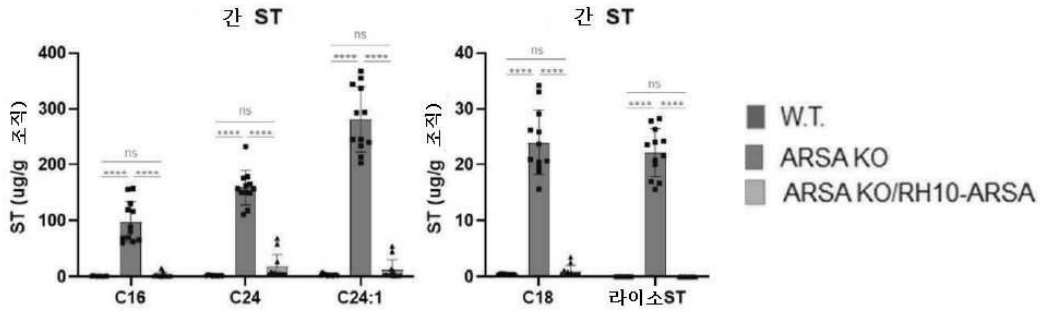
도면7b



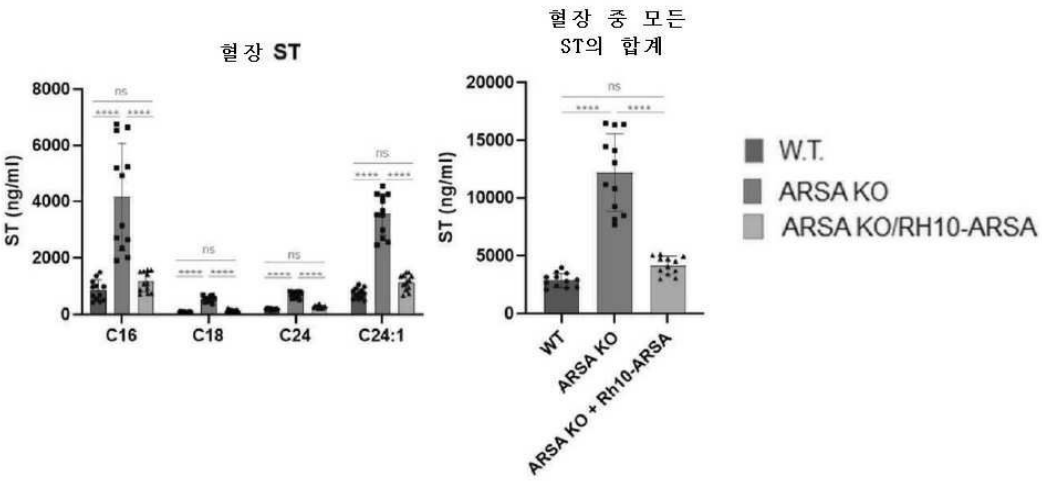
도면8a



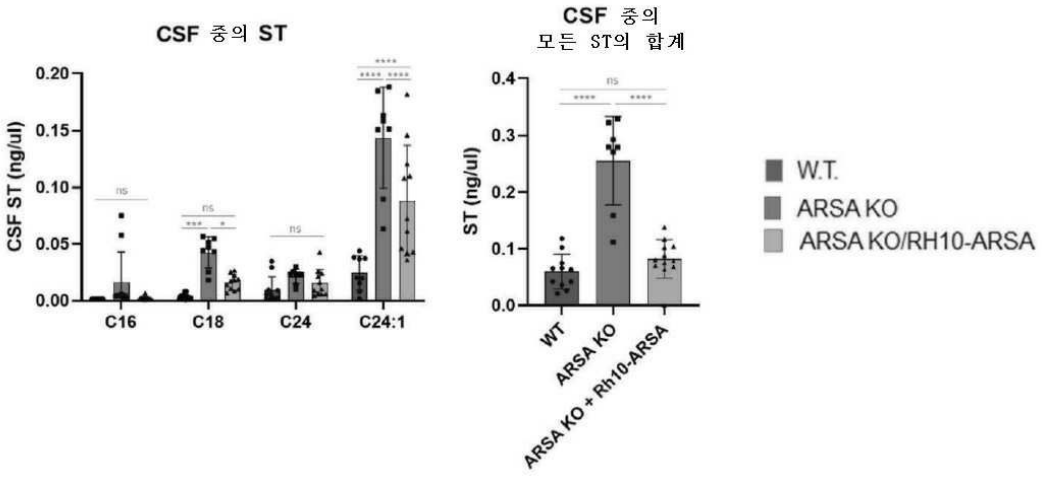
도면8b



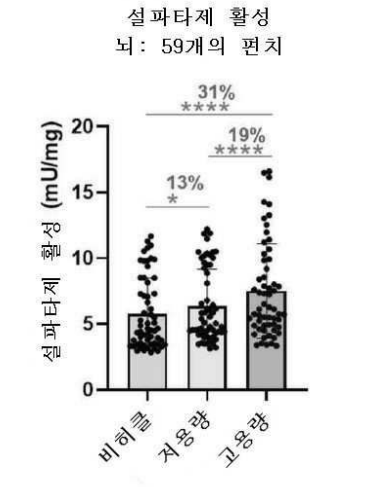
도면8c



도면8d

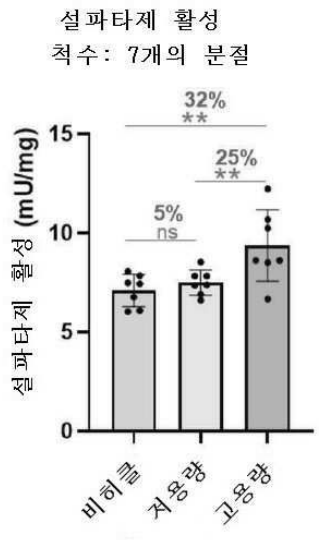


도면9a



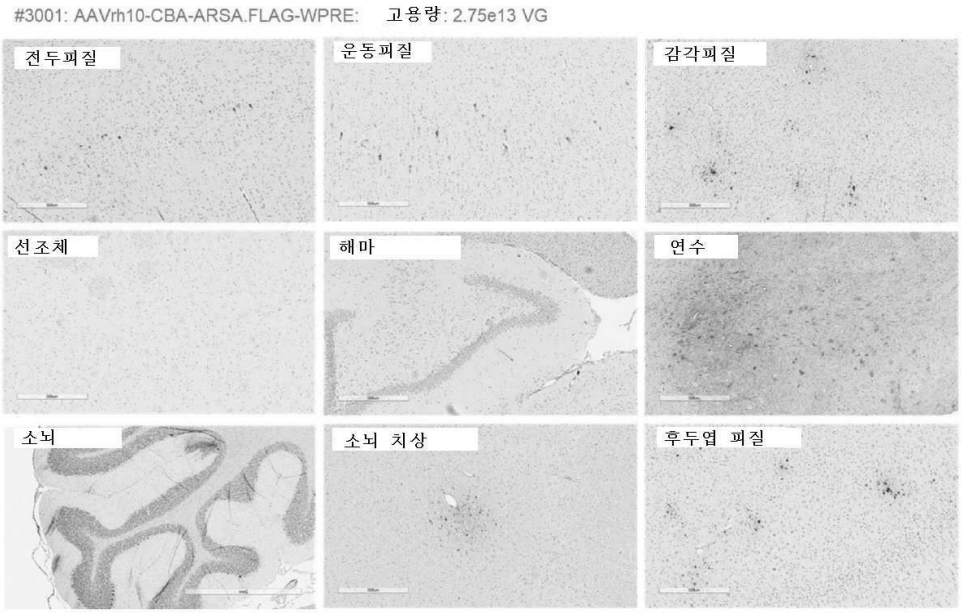
배경 위로 10% 초과의
설파타제 활성을 갖는 펀치%
저용량: 59%
고용량: 86%
3마리 NHP의 각 데이터 포인트 평균

도면9b

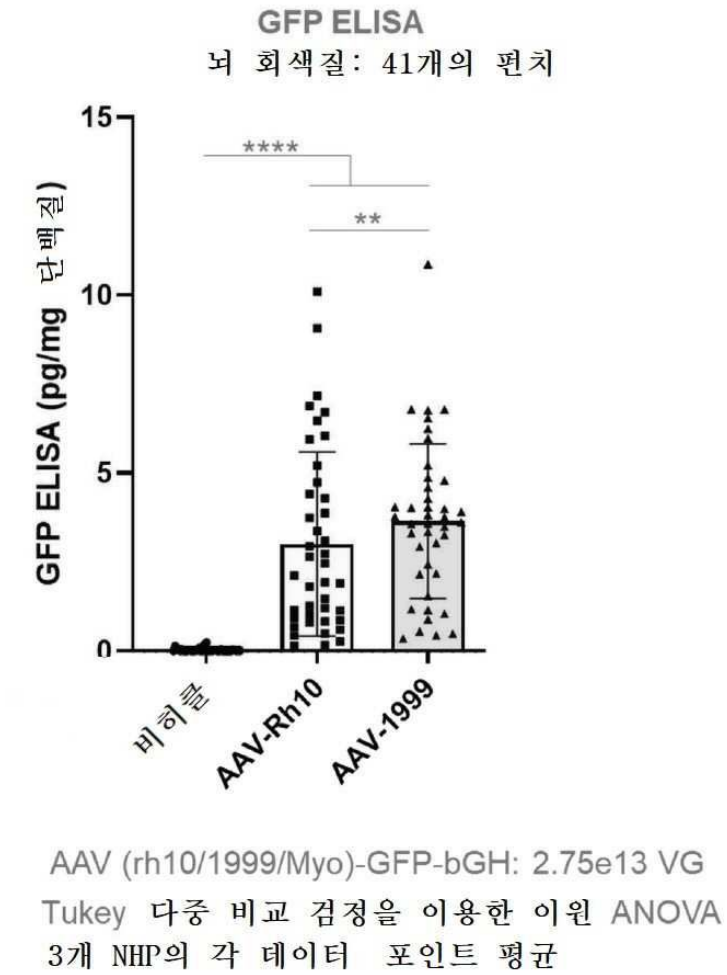


경부 분절 2, 4
흉부 분절 3, 7, 11
요부 분절 3, 5
3마리 NHP의 각 데이터 포인트 평균

도면9c

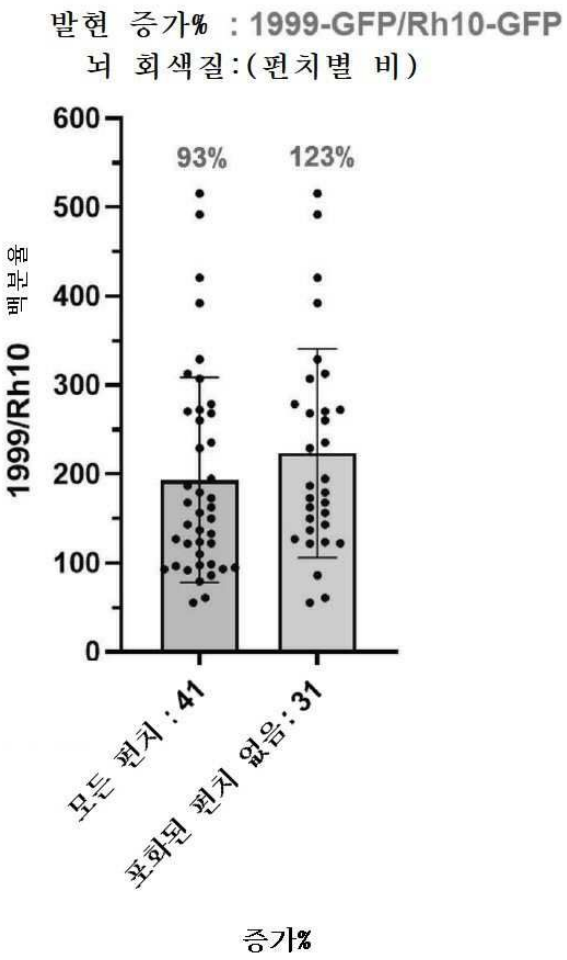


도면10a

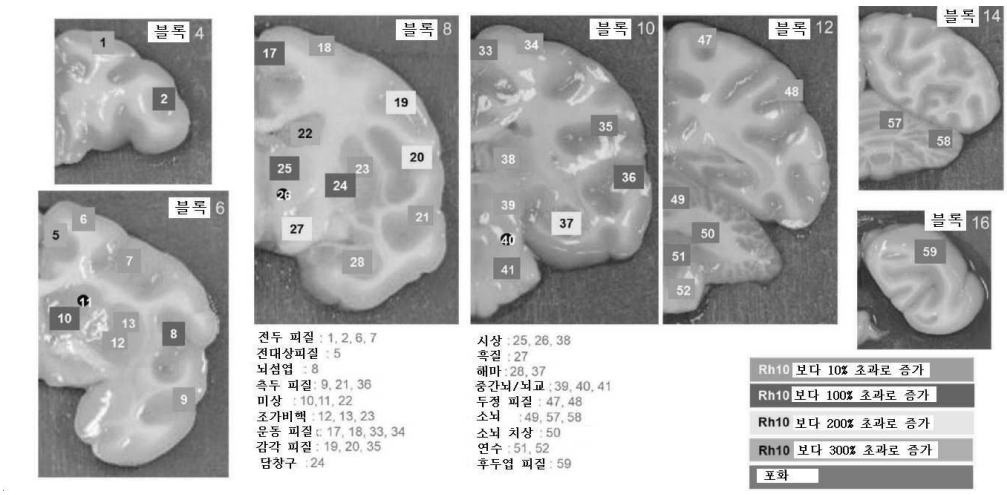


AAV (rh10/1999/Myo)-GFP-bGH: 2.75e13 VG
Tukey 다중 비교 검정을 이용한 이원 ANOVA
3개 NHP의 각 데이터 포인트 평균

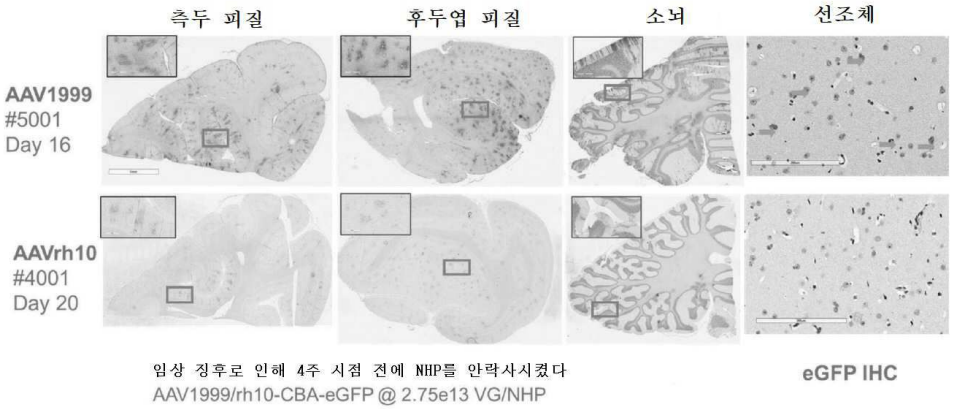
도면10b


발현 증가% : 1999-GFP/Rh10-GFP
뇌 회색질:(펀치별 비)
1999/Rh10 백분율
600
500
400
300
200
100
0
93%
123%
모든 펀치 : 41
포화된 펀치 없음 : 31
증가%

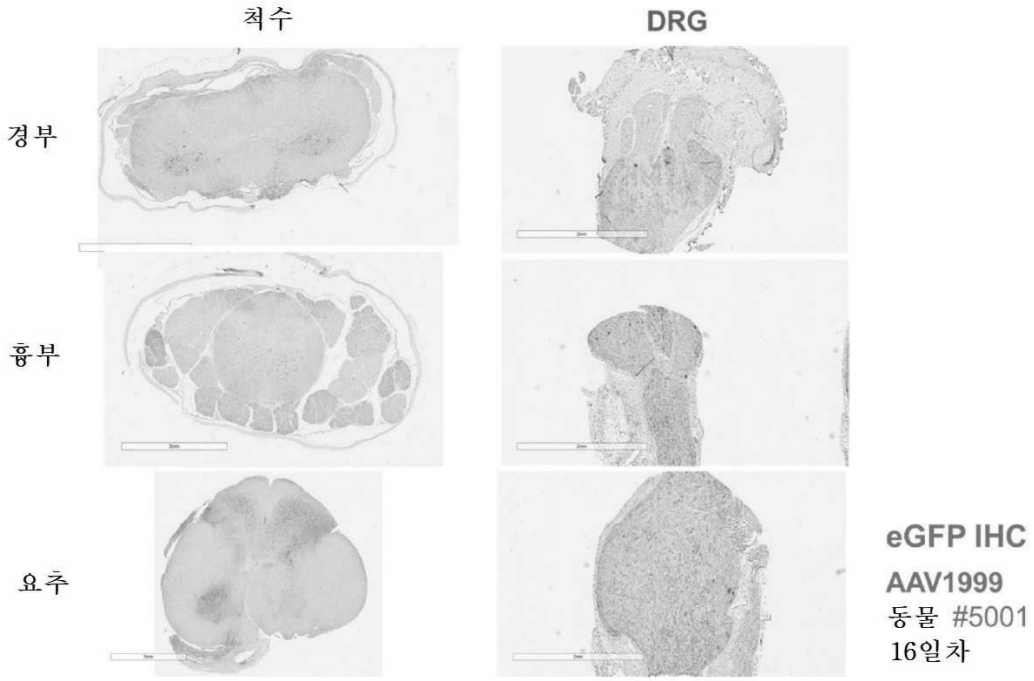
도면11


블록 4
블록 6
블록 8
블록 10
블록 12
블록 14
블록 16
전두 피질 : 1, 2, 6, 7
전대상피질 : 5
뇌섬엽 : 8
측두 피질 : 9, 21, 36
미상 : 10,11, 22
조가비핵 : 12, 13, 23
운동 피질 : 17, 18, 33, 34
감각 피질 : 19, 20, 35
담창구 : 24
시상 : 25, 26, 38
흑질 : 27
해마 : 28, 37
중간뇌/뇌교 : 39, 40, 41
두정 피질 : 47, 48
소뇌 : 49, 57, 58
소뇌 치상 : 50
연수 : 51, 52
후두엽 피질 : 59
Rh10 보다 10% 초과로 증가
Rh10 보다 100% 초과로 증가
Rh10 보다 200% 초과로 증가
Rh10 보다 300% 초과로 증가
포화

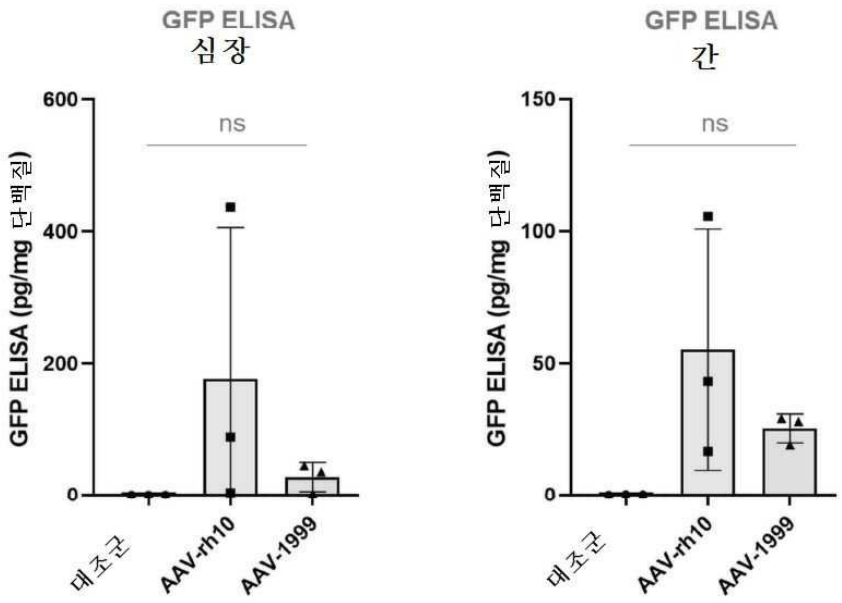
도면12


측두 피질
후두엽 피질
소뇌
선조체
AAV1999
#5001
Day 16
AAVrh10
#4001
Day 20
임상 징후로 인해 4주 시점 전에 NHP를 안락사시켰다
AAV1999/rh10-CBA-eGFP @ 2.75e13 VG/NHP
eGFP IHC

도면13

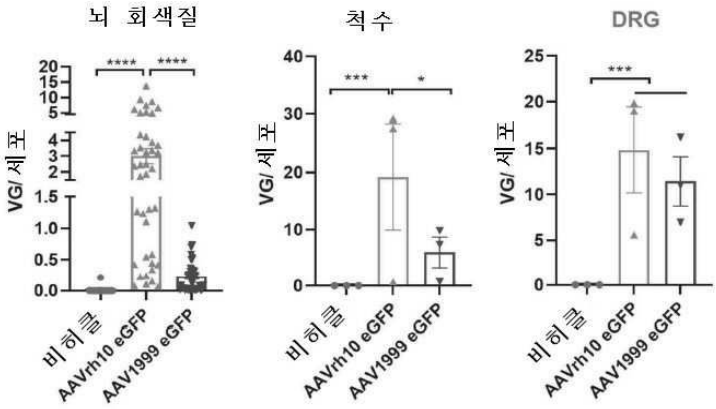

척수
DRG
경부
흉부
요추
eGFP IHC
AAV1999
동물 #5001
16일차
임상 징후로 인해 4주 시점 전에 NHP를 안락사시켰다
AAV1999/rh10-CBA-eGFP @ 2.75e13 VG/NHP

도면14

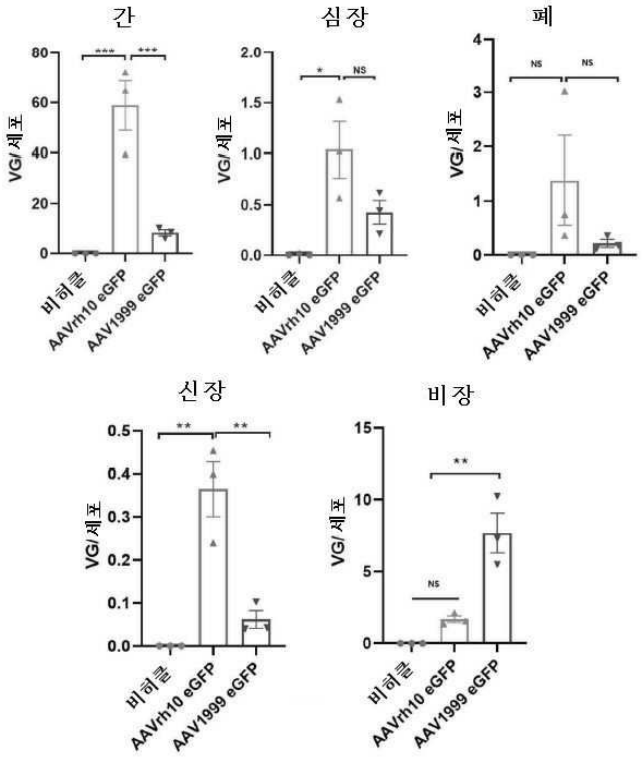


AAV (rh10/1999/Myo)-GFP-bGH: 2.75e13 VG
다중 비교 검정을 이용한 일원 ANOVA
3마리 NHP의 각 데이터 포인트 평균

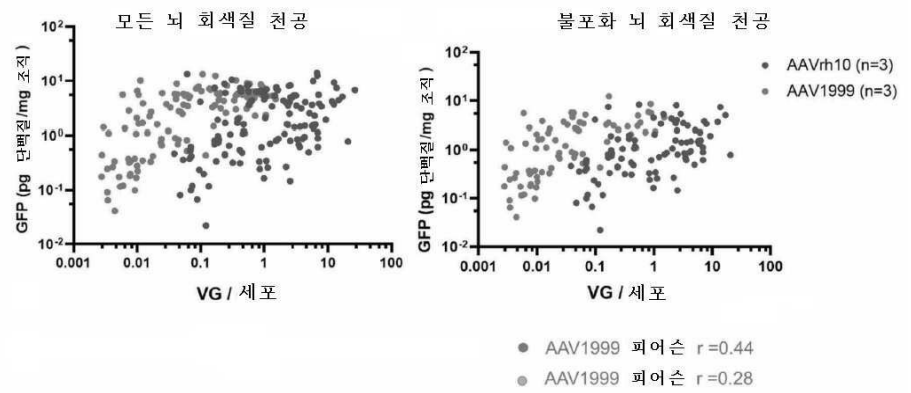
도면15a



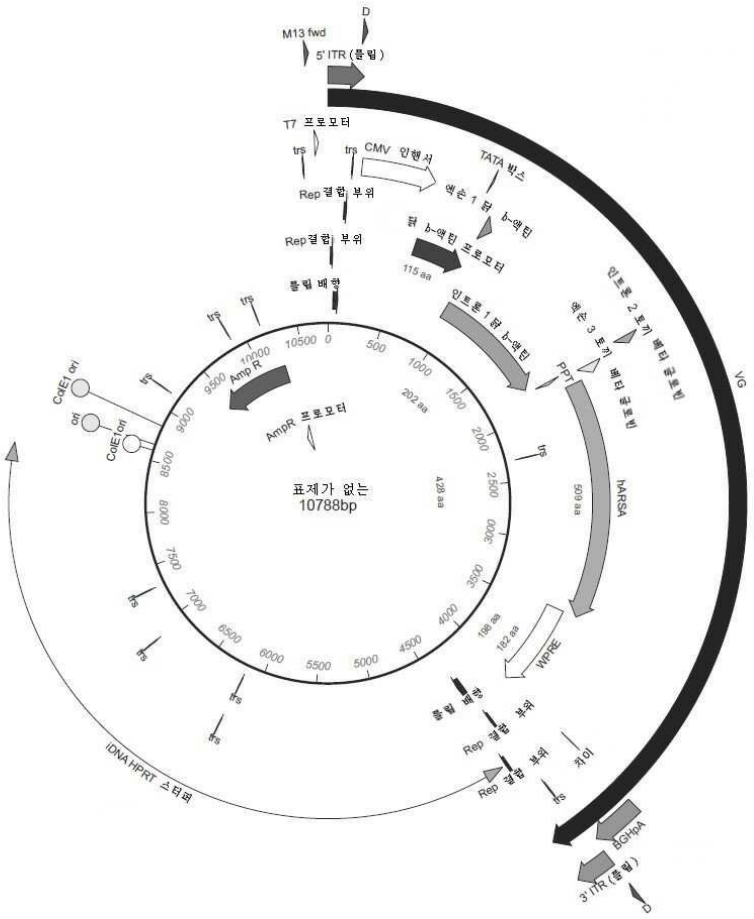
도면15b


간
심장
폐
신장
비장
VG/세포
비히클
AAVrh10 eGFP
AAV1999 eGFP
NS

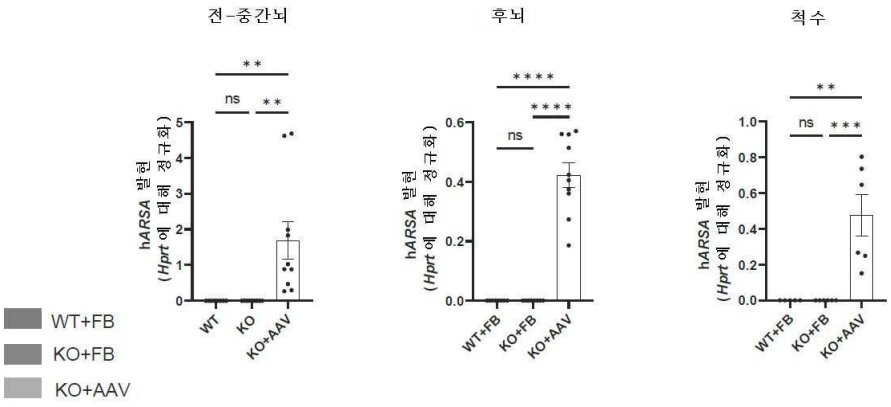
도면16


모든 뇌 회색질 천공
불포화 뇌 회색질 천공
GFP (pg 단백질/mg 조직)
VG / 세포
AAVrh10 (n=3)
AAV1999 (n=3)
AAV1999 피어슨 r =0.44
AAV1999 피어슨 r =0.28

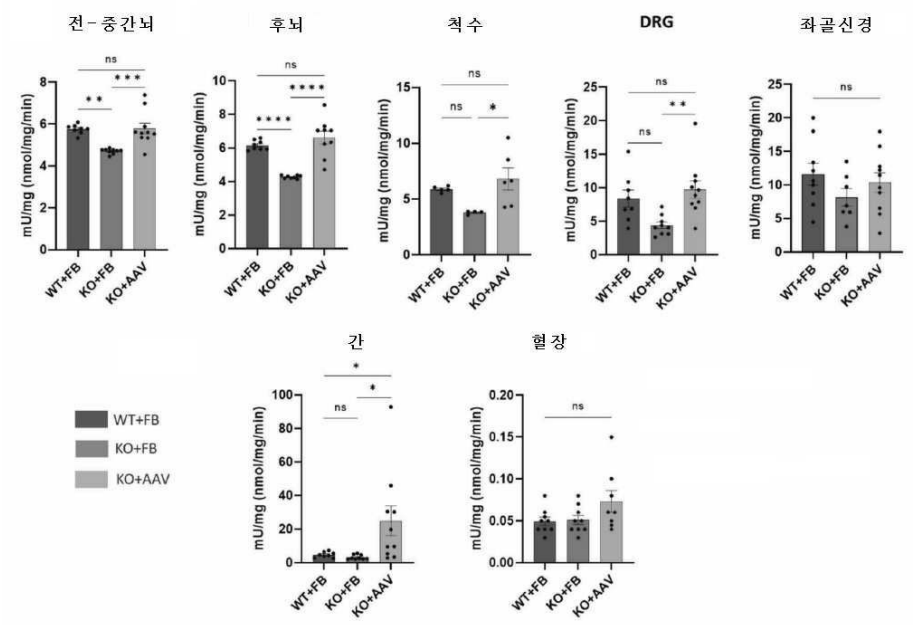
도면17


표제가 없는
10788bp
M13 fwd
5' ITR (플립)
T7 프로모터
CMV 인핸서
TATA 박스
엑손 1 팁
Rep결합 부위
플립 배향
인트론 1 팁 b-에팁
인트론 2 토끼 베타 글로빈
엑손 3 토끼 베타 글로빈
VG
PPT
hARSA
509 aa
WPRE
182 aa
198 aa
BGHpA
3' ITR (플립)
IDNA HPRT 스템퍼
ColE1 ori
Amp R
AmpR 프로모터
202 aa
128 aa
115 aa

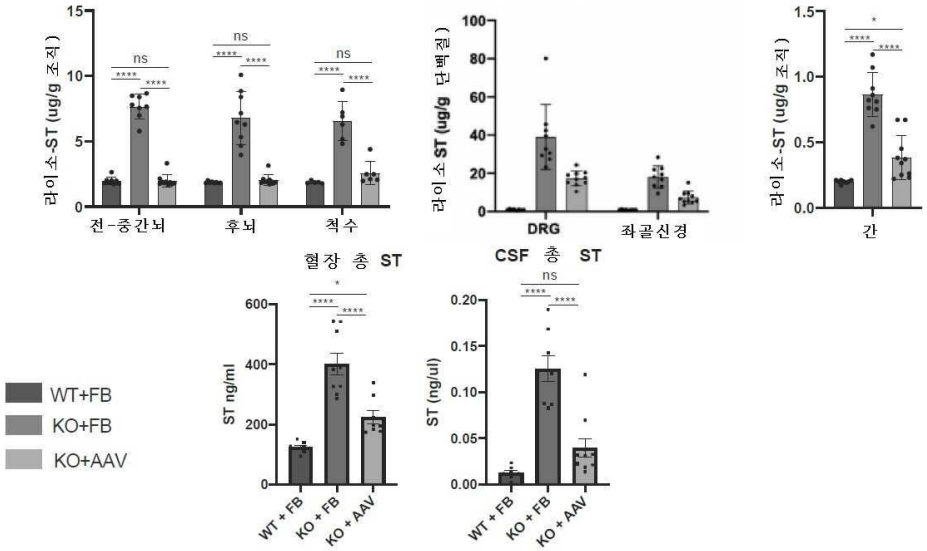
도면18


전-중간뇌
후뇌
척수
hARSA 발현
(Hprt 에 대해 정규화)
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
WT
KO
KO+AAV
ns
**
****
***

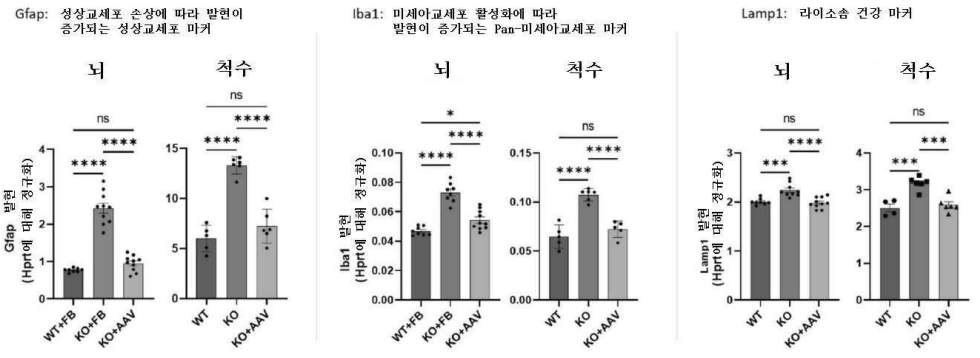
도면19


전-중간뇌
후뇌
척수
DRG
좌골신경
간
혈장
mU/mg (nmol/mg/min)
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
ns

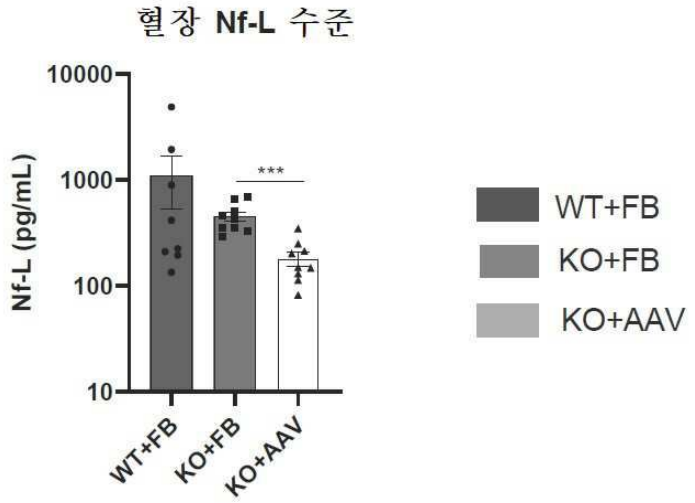
도면20


라이소-ST (ug/g 조직)
전-중간뇌
후뇌
척수
라이소 ST (ug/g 단백질)
DRG
좌골신경
CSF 총 ST
간
혈장 총 ST
ST ng/ml
ST (ng/ul)
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
ns

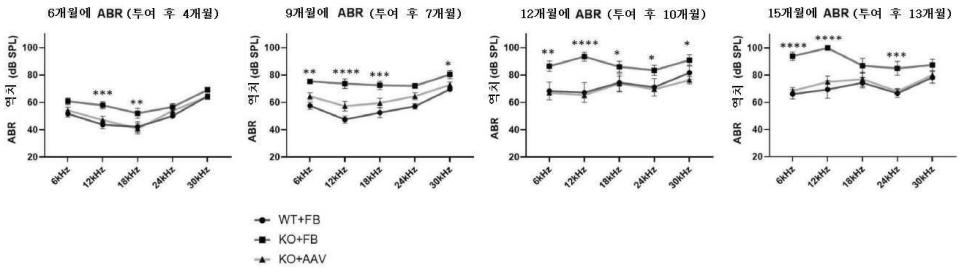
도면21



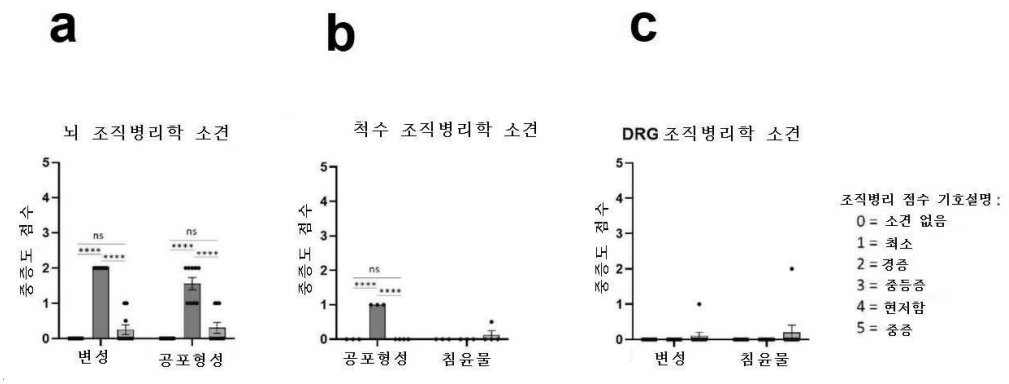
도면22



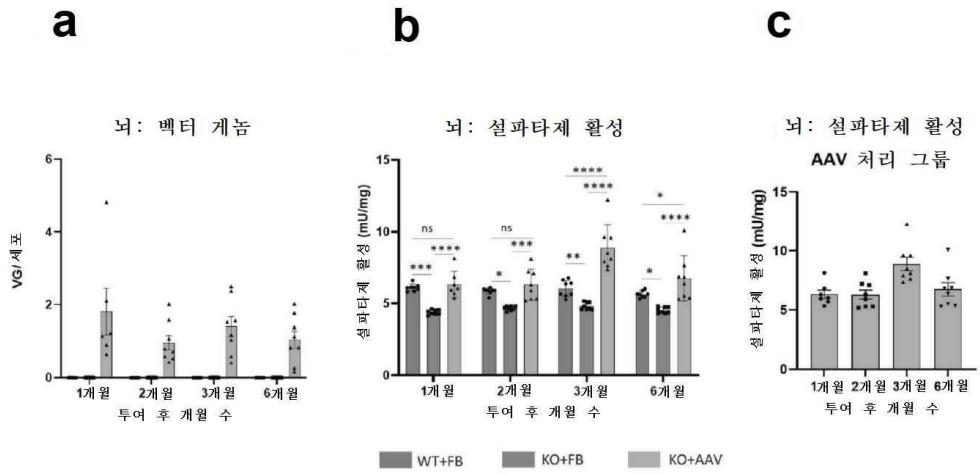
도면23



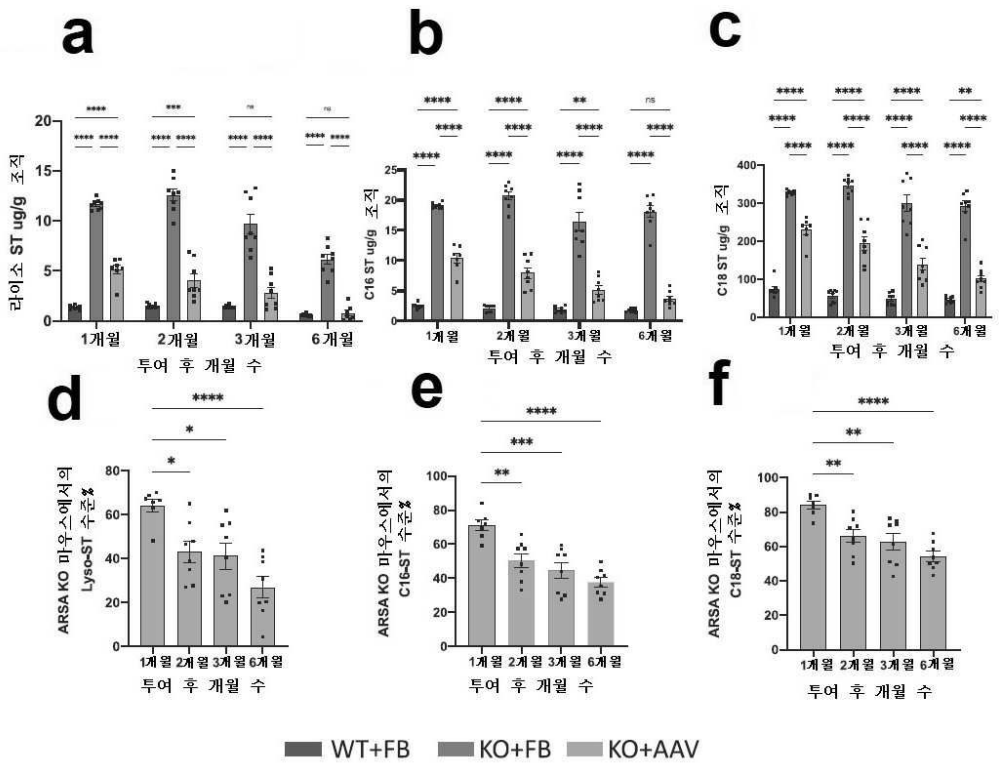
도면24


a
b
c
뇌 조직병리학 소견
척수 조직병리학 소견
DRG 조직병리학 소견
중증도 점수
변성
공포형성
침윤물
조직병리 점수 기호설명 :
0 = 소견 없음
1 = 최소
2 = 경증
3 = 중등증
4 = 현저함
5 = 중증

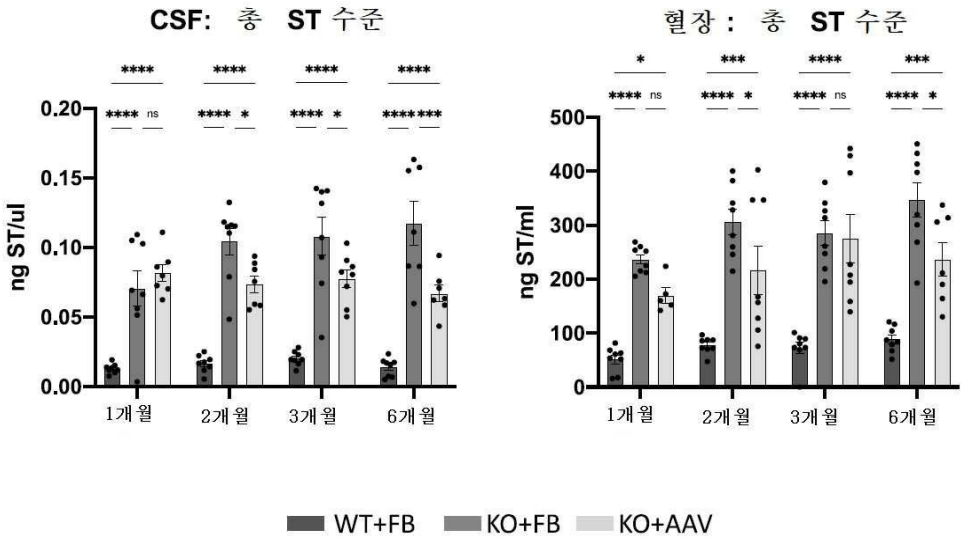
도면25


a
b
c
뇌: 벡터 게놈
뇌: 설파타제 활성
뇌: 설파타제 활성
AAV 처리 그룹
VG/세포
설파타제 활성 (mU/mg)
1개월
2개월
3개월
6개월
투여 후 개월 수
WT+FB
KO+FB
KO+AAV

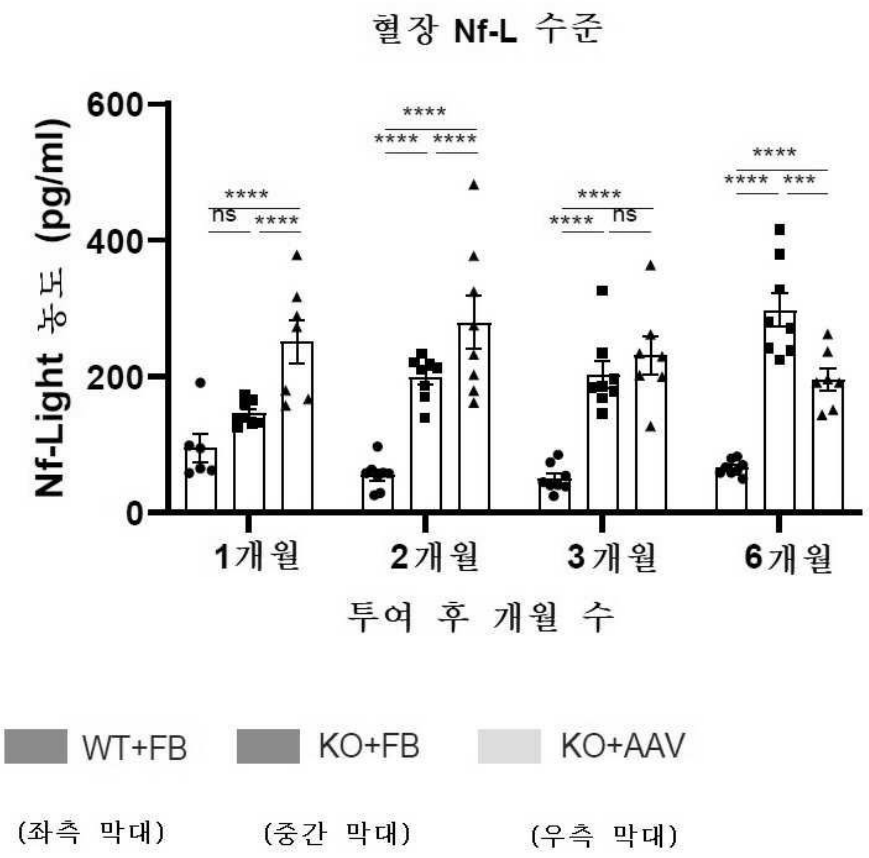
도면26


a
b
c
라이소 ST ug/g 조직
C16 ST ug/g 조직
C18 ST ug/g 조직
1개월
2개월
3개월
6개월
투여 후 개월 수
d
e
f
ARSA KO 마우스에서의 Lyso-ST 수준%
ARSA KO 마우스에서의 C16-ST 수준%
ARSA KO 마우스에서의 C18-ST 수준%
WT+FB
KO+FB
KO+AAV

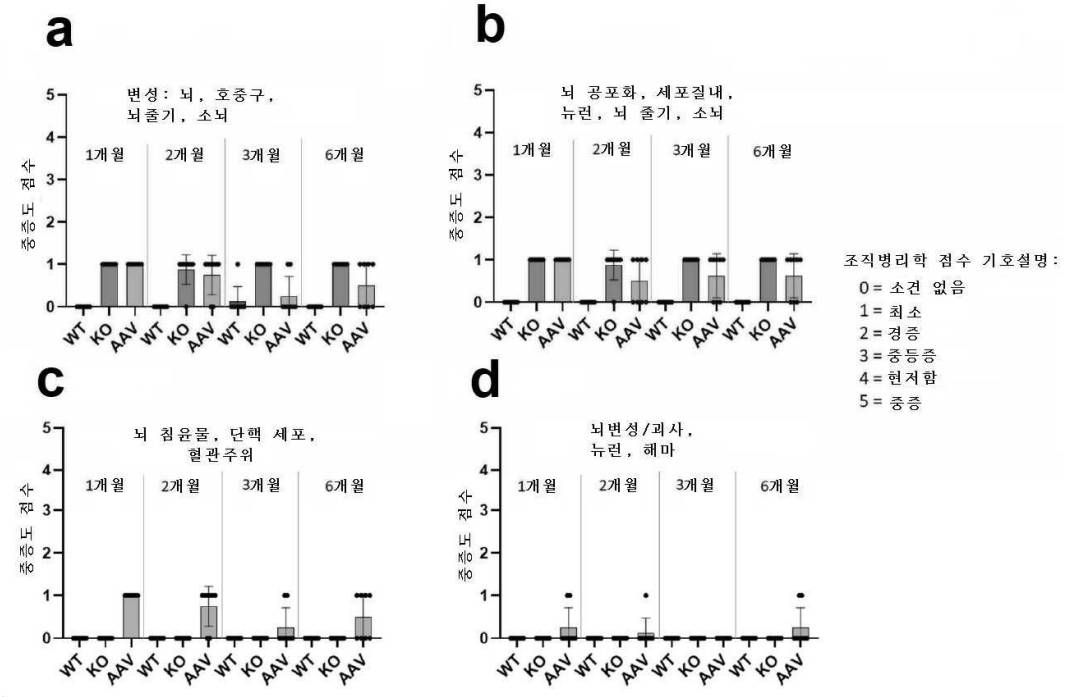
도면27


CSF: 총 ST 수준
혈장 : 총 ST 수준
ng ST/ul
ng ST/ml
1개월
2개월
3개월
6개월
WT+FB
KO+FB
KO+AAV

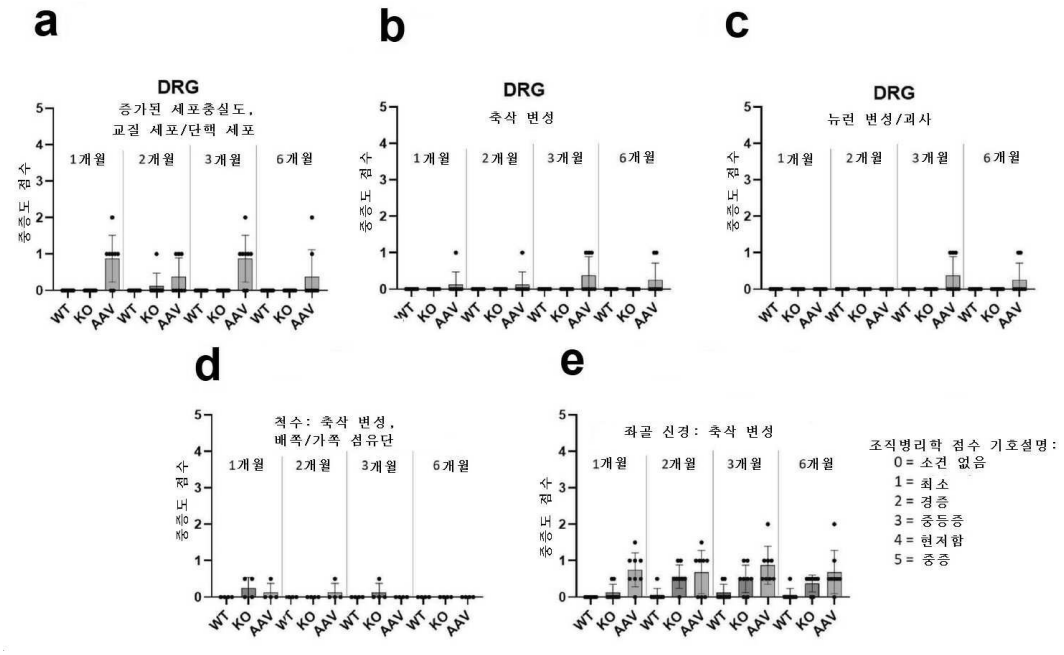
도면28


혈장 Nf-L 수준
Nf-Light 농도 (pg/ml)
600
400
200
0
****
ns
****
****
****
****
****
ns
****
****
***
1개월
2개월
3개월
6개월
투여 후 개월 수
WT+FB
KO+FB
KO+AAV
(좌측 막대)
(중간 막대)
(우측 막대)

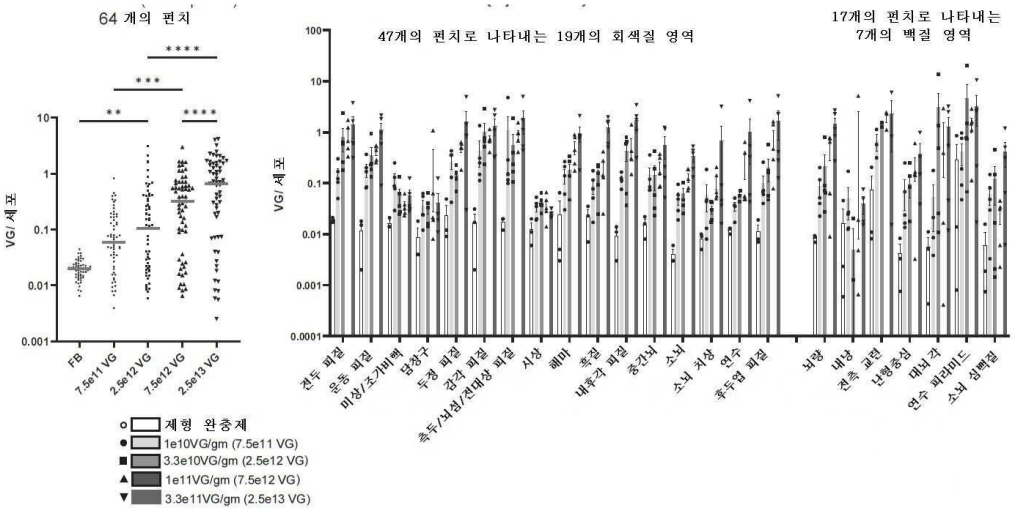
도면29


a
변성: 뇌, 호중구, 뇌줄기, 소뇌
b
뇌 공포화, 세포질내, 뉴런, 뇌 줄기, 소뇌
c
뇌 침윤물, 단핵 세포, 혈관주위
d
뇌변성/괴사, 뉴런, 해마
중증도 점수
1개월
2개월
3개월
6개월
WT
KO
AAV
조직병리학 점수 기호설명:
0 = 소견 없음
1 = 최소
2 = 경증
3 = 중등증
4 = 현저함
5 = 중증

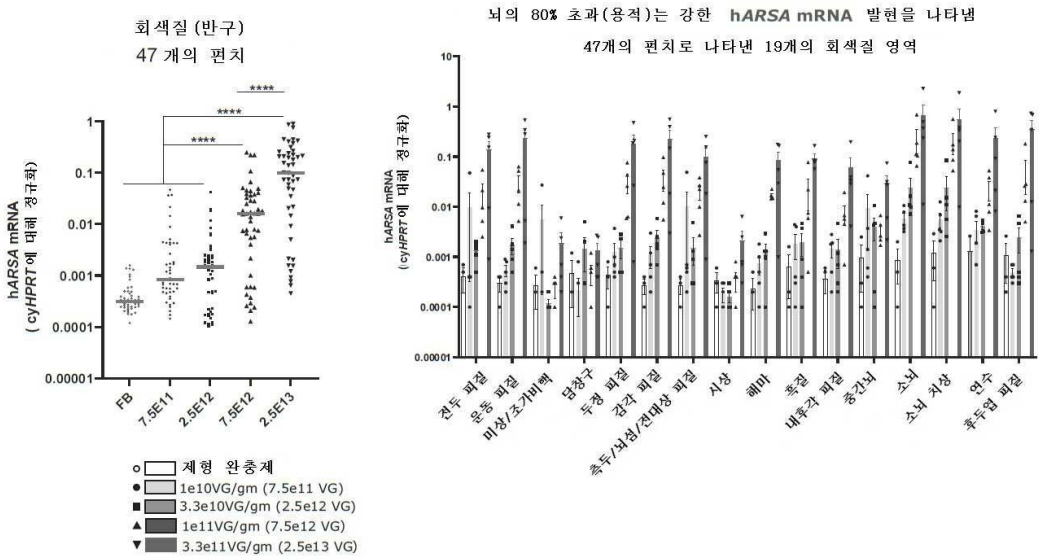
도면30


a
DRG
증가된 세포충실도,
교질 세포/단핵 세포
b
DRG
축삭 변성
c
DRG
뉴런 변성/괴사
d
척수: 축삭 변성,
배쪽/가쪽 섬유단
e
좌골 신경: 축삭 변성
충증도 점수
1개월
2개월
3개월
6개월
WT
KO
AAV
조직병리학 점수 기호설명:
0 = 소견 없음
1 = 최소
2 = 경증
3 = 중등증
4 = 현저함
5 = 중증

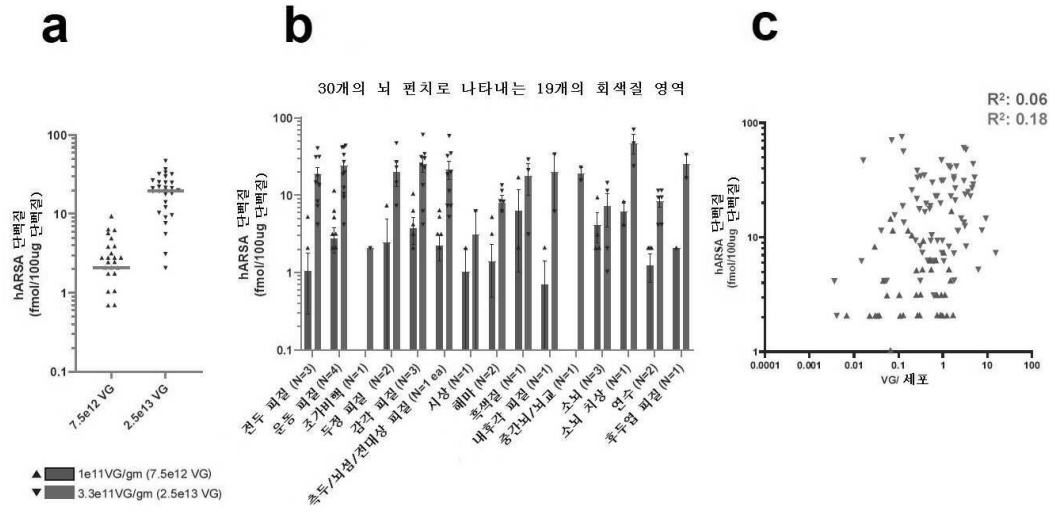
도면31


64 개의 편치
47개의 편치로 나타내는 19개의 회색질 영역
17개의 편치로 나타내는
7개의 백질 영역
VG/ 세포
FB
7.5e11 VG
2.5e12 VG
7.5e12 VG
2.5e13 VG
제형 완충제
1e10VG/gm (7.5e11 VG)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VG)
1e11VG/gm (7.5e12 VG)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VG)

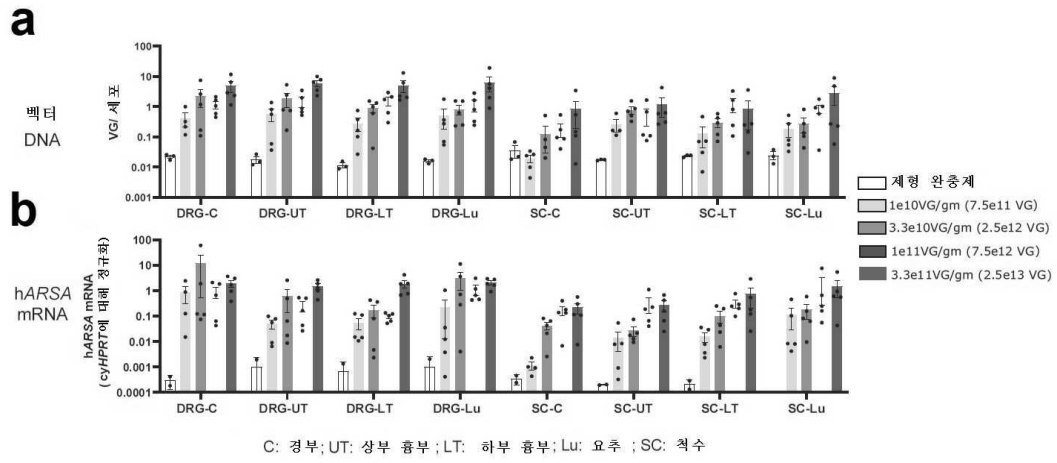
도면32



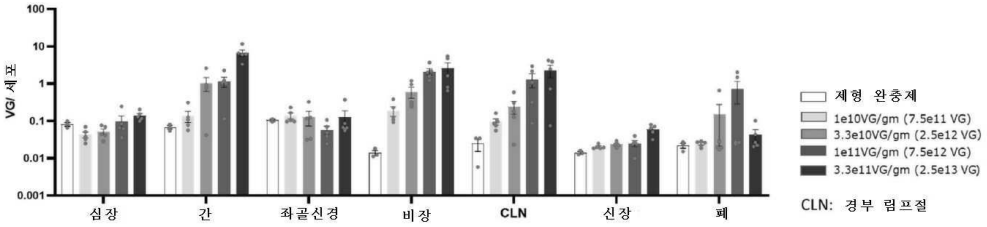
도면33



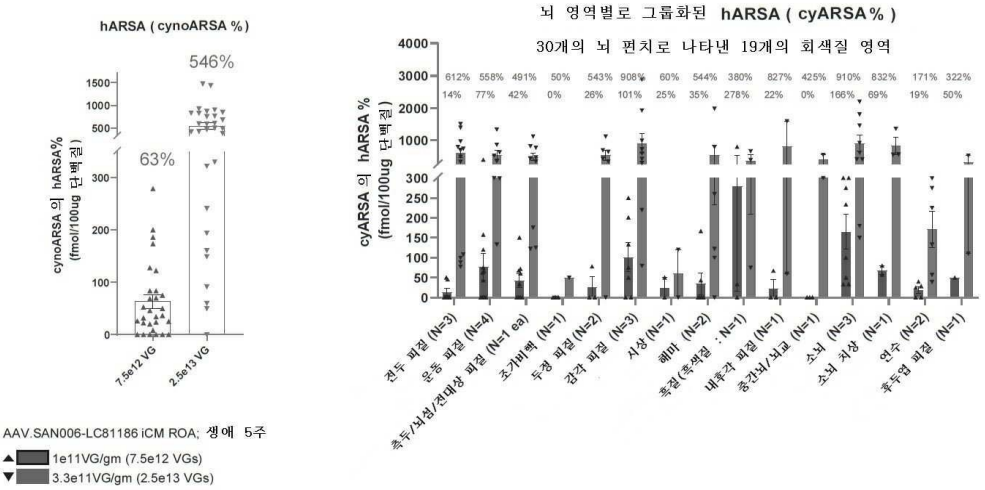
도면34



도면35

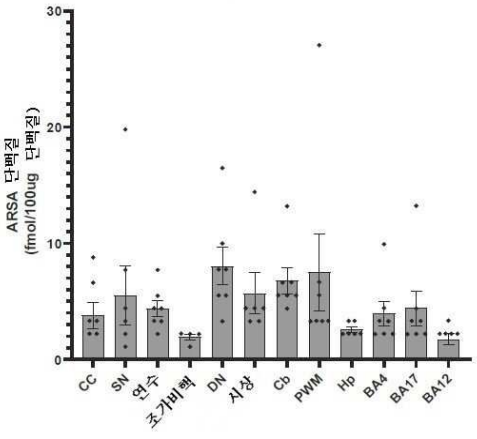


도면36



도면37a

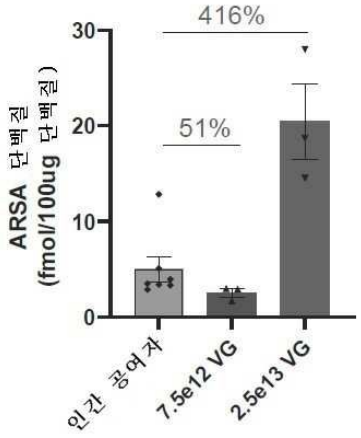
7명의 건강한 3 내지 8세 공여자로부터의 인간 뇌는
평균적으로 **100ug** 총 단백질당 **4.9 fmol ARSA** 단백질을 갖는다



BA, 브로드만 영역; CC, 뇌량 ; Cb, 소뇌 ; DN, 치상핵 ;
Hp, 해마 ; PWM, 뇌실주위 백질 ; SN, 흑색질

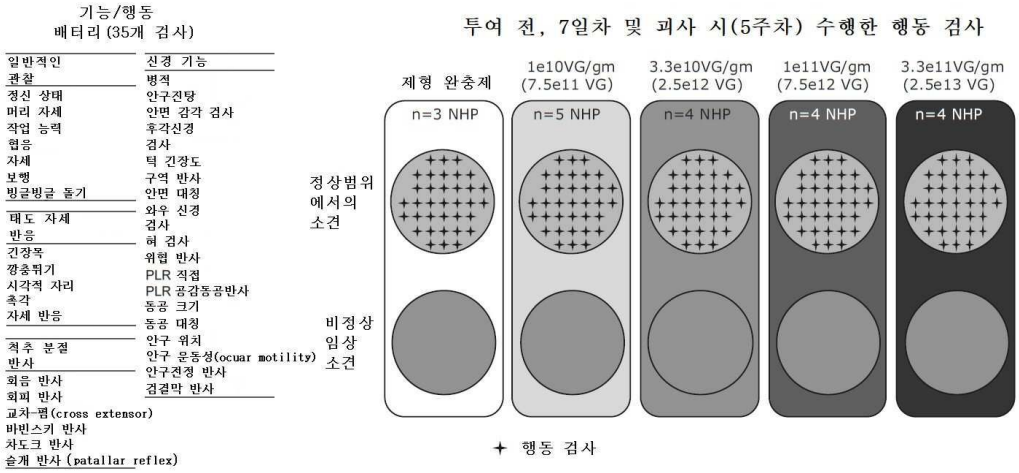
도면37b

NHP 뇌에서의 hARSA 단백질은 7명의 건강한 3 내지 8세 공여자의 뇌의 ARSA 단백질 수준의 51% (1e11VG/gm) 및 416% (3.3e11VG/gm) 이다

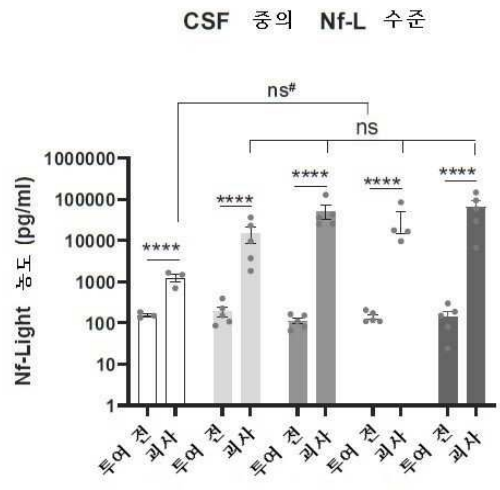


◆ hARSA: 7명의 건강한 공여자(3 내지 8세)로부터의 12개 뇌 영역
▲ hARSA: 1e11VG/gm (7.5e12 VG); n=3 NHP; iCM ROA
▼ hARSA: 3.3e11VG/gm (2.5e13 VG); n=3 NHP; iCM ROA

도면38

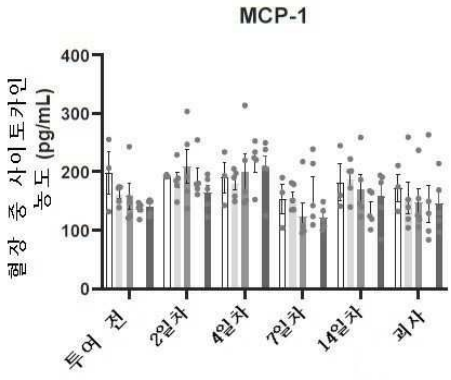


도면39a



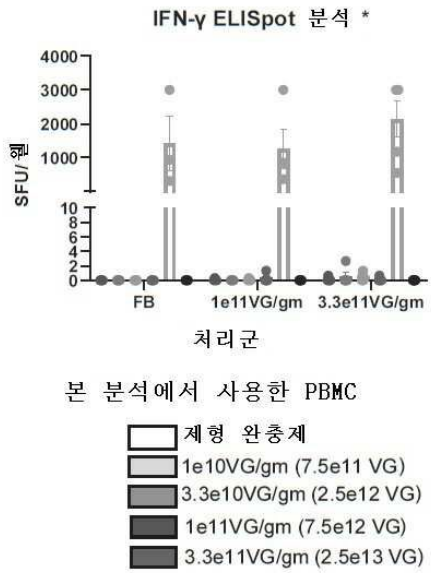
투여 전과 괴사 사이의 6주

도면39b

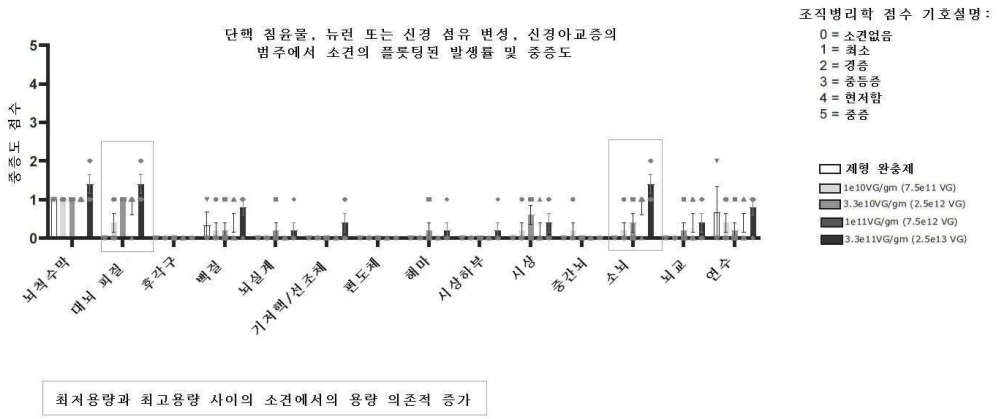


전염증 사이토카인 : IL-6, IL-8, IFN-γ, IL-1β, IL-1ra, MCP-1, MIP-1β , G-CSF, GM-CSF, IL-18 및 TNF-α
T 세포 활성화 사이토카인: IL-2, IL-4

도면39c

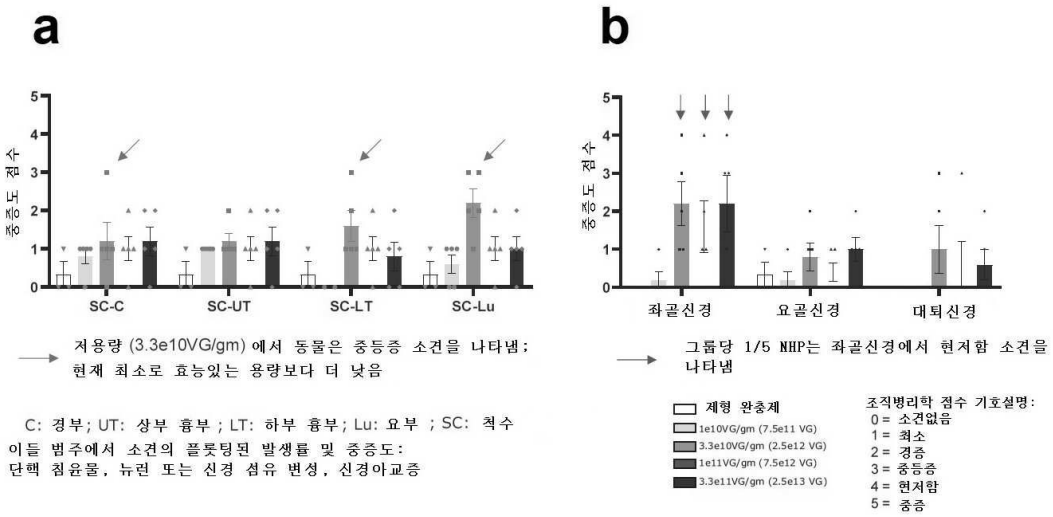


도면40

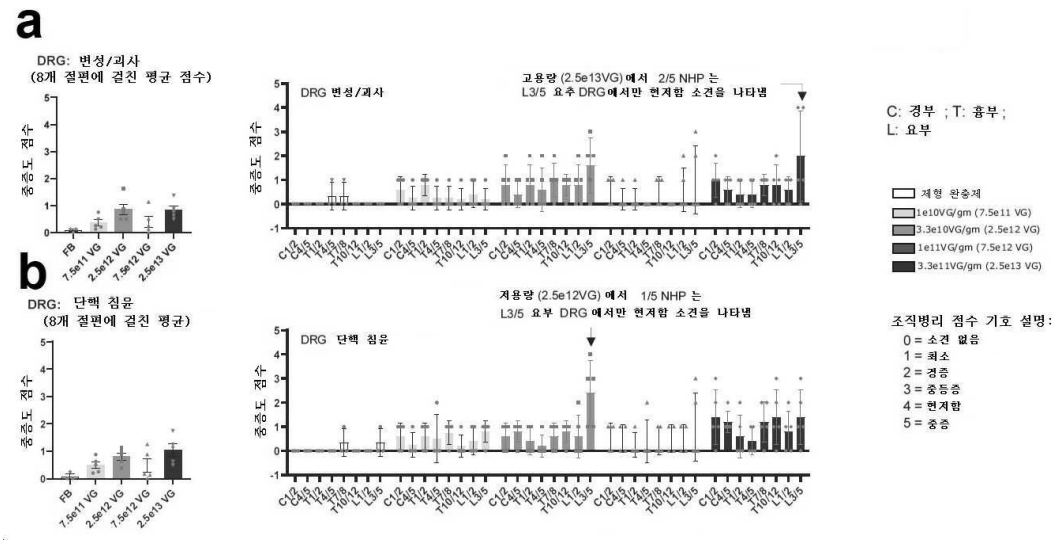


최저용량과 최고용량 사이의 소견에서의 용량 의존적 증가

도면41



도면42


a
DRG: 변성/괴사
(8개 절편에 걸친 평균 점수)
중증도 점수
FB
7.5e11 VG
2.5e12 VG
7.5e12 VG
2.5e13 VG
DRG 변성/괴사
고용량 (2.5e13VG) 에서 2/5 NHP 는
L3/5 요추 DRG에서만 현저함 소견을 나타냄
C: 경부 ; T: 흉부 ;
L: 요부
제형 완충제
1e10VG/gm (7.5e11 VG)
3.3e10VG/gm (2.5e12 VG)
1e11VG/gm (7.5e12 VG)
3.3e11VG/gm (2.5e13 VG)
b
DRG: 단핵 침윤
(8개 절편에 걸친 평균)
DRG 단핵 침윤
저용량 (2.5e12VG) 에서 1/5 NHP 는
L3/5 요부 DRG 에서만 현저함 소견을 나타냄
조직병리 점수 기호 설명:
0 = 소견 없음
1 = 최소
2 = 경증
3 = 중등증
4 = 현저함
5 = 중증

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.