



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월21일

(11) 등록번호 10-2719222

(24) 등록일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/64 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/6421 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7036041

(22) 출원일자(국제) 2018년05월11일

심사청구일자 2021년05월06일

(85) 번역문제출일자 2019년12월05일

(65) 공개번호 10-2020-0023280

(43) 공개일자 2020년03월04일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/032278

(87) 국제공개번호 WO 2018/209205

국제공개일자 2018년11월15일

(30) 우선권주장

62/599,816 2017년12월18일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160035596 A

W02015164723 A1

W02017070678 A1

(73) 특허권자

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아

미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 씨빅 센터
블러바드 3600, 9플로어

(72) 발명자

윌슨 제임스 엠.

미국 펜실베이니아 19103 필라델피아 텔란시 스트리트 1831

카츠 네이션

미국 코네티컷 06907 스탬포드 호프 스트리트
1111 유닛 3

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인와이에스장

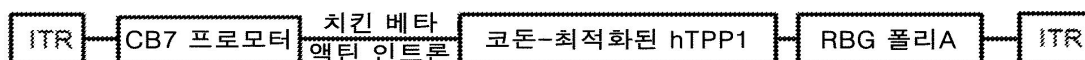
전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 신경 세포이드 지질갈색소증에 대한 유전자 요법

(57) 요약

바텐병의 치료를 위한 방법 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 이러한 조성물은 재조합 아데노-연관된 바이러스(rAAV)를 포함하고, 상기 rAAV는 AAV 캡시드, 및 그 안에 포장된 벡터 게놈을 포함하고, 상기 벡터 게놈은 (a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열; (b) 프로모터; (c) 인간 TPP1을 인코딩하는 CLN2 코딩 서열; (d) AAV 3' ITR을 포함한다.

대 표 도

(52) CPC특허분류

A61K 9/10 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

(72) 발명자

힌더러 크리스티안

미국 펜실베이니아 19123 필라델피아 브라운 스트리트 212 아파트먼트 8에이

호르도 줄리엣

미국 펜실베이니아 19147 필라델피아 사우스 밀드레드 스트리트 712

(30) 우선권주장

62/652,006 2018년04월03일 미국(US)

62/504,817 2017년05월11일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

AAV 캡시드, 및 그 안에 포장된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV)로서, 상기 벡터 게놈은,

- (a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열;
- (b) 프로모터;
- (c) 인간 TPP1을 인코딩하는 CLN2 코딩 서열; 및
- (d) AAV 3' ITR 서열을 포함하고,

상기 CLN2 코딩 서열은 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 1 내지 1689를 포함하는, 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (c)의 코딩 서열은
서열번호: 3의 뉴클레오타이드 1 내지 1689인, rAAV.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로모터는
(i) 치킨 베타 액틴 (CBA) 프로모터; 또는
(ii) CBA 프로모터 서열 및 사이토메갈로바이러스 향상제 인자를 포함하는 하이브리드 프로모터인, rAAV.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 AAV 5' ITR 서열 및/또는 AAV3' ITR 서열은 AAV2로부터의 것인, rAAV.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 폴리A를 추가로 포함하는, rAAV.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리A는 합성 폴리A이거나 또는 소과 성장 호르몬 (bGH), 인간 성장 호르몬 (hGH), SV40, 토끼 β -글로빈 (RGB), 또는 변형된 RGB (mRGB)로부터의 것인, rAAV.

청구항 7

제1항에 있어서, 인트론을 추가로 포함하는, rAAV.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 인트론은 CBA, 인간 베타 글로빈, IVS2, SV40, bGH, 알파-글로불린, 베타-글로불린, 콜라겐, 난백알부민, 또는 p53으로부터의 것인, rAAV.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 향상제를 추가로 포함하는, rAAV.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 향상제는 CMV 향상제, RSV 향상제, ABP 향상제, ABPS 향상제, 알파 mic/bik 향상제, TTR

향상제, en34 향상제, 또는 ApoE인, rAAV.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 크기가 3 킬로베이스 내지 5.5 킬로베이스이거나, 또는 크기가 4 킬로베이스인, rAAV.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 AAV9 캡시드인, rAAV.

청구항 13

(i) 중추신경계로의 전달; 또는

(ii) 뇌실내 (ICV) 전달에 적합한,

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 rAAV 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 14

바텐병이 있는 대상체에게 투여하기 적합한 수성 현탁액으로서, 상기 수성 현탁액은 수성 현탁 액체 및 바텐병에 대한 치료제로서 유용한 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV)를 포함하고, 상기 rAAV는 AAV 캡시드를 가지며, 다음:

(a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열;

(b) 프로모터;

(c) 인간 TPP1을 인코딩하는 코딩 서열; 및

(d) AAV 3' ITR 서열

을 포함하는 벡터 게놈을 그 안에 포장하여 가지며,

상기 CLN2 코딩 서열은 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 1 내지 1689를 포함하는, 수성 현탁액.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 수성 현탁액은

(i) 척수강내 전달; 또는

(ii) ICV 및 척수강내 요추 (IT-L) 주사로부터 선택된 척수강내 전달에 적합한, 수성 현탁액.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 수성 현탁액은 수성 현탁 액체에 용해된 계면활성제, 보존제, 및/또는 완충액을 추가로 포함하는, 수성 현탁액.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 3396 내지 4061이고 인간 TPP1을 인코딩하는 CLN2 코딩 서열은 서열번호: 3의 뉴클레오타이드 1 내지 1689인, 수성 현탁액.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 AAV 5' ITR 서열은 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 3199 내지 3328이고 AAV 3' ITR 서열은 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 248 내지 377인, 수성 현탁액.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 서열번호: 5의 뉴클레오타이드 33 내지 159의 폴리A 서열을 추가로 포함하는, 수성 현탁액.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 AAV9 캡시드인, 수성 현탁액.

청구항 21

제13항에 있어서, 바텐병이 있는 대상체를 치료하는데 사용하기 위한, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 rAAV는 수성 현탁액 중 1×10^9 내지 1×10^{15} rAAV의 용량으로 투여되는, 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 rAAV는 1 내지 20 밀리리터를 포함하는 용적에서 1×10^9 내지 1×10^{13} rAAV의 용량으로 투여되는, 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 대상체는 인간인, 조성물.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 전자적 형태로 제출된 자료의 참조에 의한 편입

[0002] 출원인은 본 명세서와 함께 전자적 형태로 제출된 서열목록 자료를 참조로 포함한다. 이 파일은 "UPN-17-8151PCT_Seq_List_ST25.txt"로 표시되어 있다.

배경 기술

[0003] 신경 세로이드 지질갈색소증 (NCL)은 드문 선천적 신경퇴행성 장애의 그룹이다. 그것들은 환자에서 관찰되는 세로이드 및 지갈소와 유사한 자가형광 지질안료의 축적과 함께 신경유전적 축적 질환의 가장 흔한 것으로 간주된다. NCL은 비정상적으로 증가된 근육 톤 또는 경련, 시각상실 또는 시력 문제, 치매, 근육 공조의 부족, 지적 장애, 운동 장애, 발작 및 불안정적인 보행을 포함하여 가변성으로 여전히 진행성인 증상과 연관이 있다. 이 질환의 빈도는 12,500 명당 대략 1 명이다. NCL의 3가지 주요 유형이 있다: 성인 (Kufs 또는 Parry 질환); 유년 및 후기 유아 (얀스키-빌쇼스키 질환). 신경 세로이드 지질갈색소증 (NCL)은 본래 (본 명세서에서 언급된 바와 같이) 그것의 개시 연령 및 임상 증상에 의해 정의된다. 그러나, 그들은 이후 새로운 분자 발견에 기초하여 재분류되었으며, 이는 이전에 임상 표현형에 의해 제안된 것보다 상이한 유전자 변이체에 대해 훨씬 더 많은 중복의 증거를 제공하였다.

[0004] NCL과 관련하여 적어도 20개 유전자가 확인되었다. CLN2 돌연변이를 갖는 NCL 환자는 트리펩티달 펩티다아제 1 (TTP 1)로 불리는 펩스타틴-비감수성 리소좀 펩티다아제에서 결핍되어 있다. TTP 1은 폴리펩타이드의 N-말단으로부터 트리펩타이드를 제거한다. CLN2 유전자의 13개 엑손 모두에서 돌연변이가 보고되었다. 일부 돌연변이는 더 장기 과정을 초래한다. 비록 발병은 일반적으로 늦은 유아기에서 하지만, 더 늦은 발병은 기재되었다. CLN2에는 58개 초과 돌연변이가 기재되어 있다.

[0005] 바텐병의 형태인 CLN2 질환은 100,000 명의 출산 당 0.07-0.51의 추정된 발병률을 갖는 희귀한 리소좀 축적 장애 (LSD)이다 (Augestad 등, 2006; Claussen 등, 1992; Mole 등, 2013 National Batten Disease Registry; Poupetova 등, 2010; Santorelli 등, 2013; Teixeira 등, 2003). CLN2 질환은 염색체 1 lq15에 위치하고 가용성 리소좀 효소 트리펩티달-펩티다아제-1 (TPP1)을 인코딩하는 CLN2 유전자에서의 돌연변이에 의해 야기된 치명적인 상염색체 열성 신경퇴행성 LSD이다. CLN2 유전자에서의 돌연변이 및 TPP1 효소적 활성에서의 후속적인 결핍은 저장 물질의 리소좀 축적 및 뇌와 망막의 신경퇴행을 초래한다 (Liu 등, 1998; Wlodawer 등, 2003). CLN2 질환은 일반적으로 재발성 발작 (간질) 및 운동을 조정하는 어려움 (운동실조증)을 포함하는 초기 특징을 갖는 2-4 세에서 초기 발병을 특징으로 한다. 본 질환은 또한 이전에 획득한 기술 (발달 퇴행)의 손실을 초래한다. 간질은 종종 의료 요법에 대해 난치성이고, 정신운동 기능의 일반적인 쇠퇴는 중간-소아기에 조기 사망하기 전에 3번째와 5번째 생일 (Schulz 등, 2013) 사이에서 신속하고 균일하다 (Nickel M 등, 2016; Worgall 등, 2007).

[0006] 재조합 TPP1 (Brineura® cerliponase alfa, BioMarin Pharmaceuticals)로 효소 대체 요법 (ERT)은 CLN2 질환의 치료에 대해 미국 (US) 및 유럽 연합 (EU)에서 최근에 승인되었고 영구적으로 이식된 디바이스를 통해 측면 심실 안으로 격주로 주입으로 투여된다. Brineura®의 임상 이득은 FDA에 의해 운동 기능의 안정화로 제한되도록 지정된 반면, 유럽 의약청 (EMA)은 언어 기술에 대해서도 긍정적인 영향이 있었다고 판단했다 (Brineura®, FDA 승인 기준 요약; Brineura® 유럽 공공 평가 보고서 [EPAR]; Schulz 등, 2016). Brineura®는 뇌 안으로 직접적으로 포트의 이식을 위해 특화된 전문지식이 필요하며 뇌심실내 (ICV) 투여에 대해 잘 알고 있는 숙련된 전문가에 의해 건강관리 환경에서 2주마다 4-시간 주입 동안 투여되어야 한다. 각각 7시간 및 11.5일로 추정되는 Brineura®의 짧은 CSF 및 리소좀 반감기로 인해 부분적으로 반복 주입이 필요하다 (Brineura®, EPAR). 따

라서, ERT의 반복 투여와 연관된 높은 환자 부담 및 이환율 없이 CLN2 질환이 있는 환자의 중추신경계 (CNS)에서 내구성 및 장기간 TPP1 효소적 활성을 제공할 수 있는 신규한 요법에 대한 상당한 미충족 필요성이 남아있다. 따라서, CLN2 질환을 치료할 필요가 있는 대상체에서 TPP1을 전달 및 발현하는데 유용한 조성물이 필요하다. 갯과 TPP1을 발현하는 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV) (rAAV2.caTPP 1)의 1회용 투여는 뇌실막 세포에서 우세하게 TPP1의 높은 발현과 임상 이득을 야기하는 뇌척수액 안으로 효소의 분비를 초래하는 것으로 나타났다. 본 명세서에 참고로 편입되는 문헌 Katz 등, Sci Transl Med. 2015 Nov 11; 7(313): 313ral 80; 및 KATZ, 등, Gene therapy 2017 Feb 24(4): 215-223 참고. 그러나, AAV2는 뇌 실질을 관통하지 않고 뉴런을 표적으로하지 않고, 따라서 신규한 신경친화성 AAV로 달성될 수 있는 것에 비교해 기대되는 이점을 제한한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0007] 일 양태에서, 인간 트리펩티딜 펩티다아제 1 (TPP1)을 인코딩하는 서열번호: 3의 코돈 최적화된, 조작된 핵산 서열이 본 명세서에 제공된다.
- [0008] 또 다른 양태에서, 인간 TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 CLN2 핵산 서열 서열번호: 3을 포함하는 발현 카세트가 본 명세서에 제공된다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 인간 CLN2는 서열번호: 2의 천연 인간 코딩 서열에 적어도 70% 동일하다. 서열번호: 2 (천연) 및 서열번호: 3 (코돈 최적화된)의 정렬은 도 15A-15B에 제공되어 있다.
- [0009] 또 다른 양태에서, 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV)가 제공된다. 일 구현예에서, 상기 rAAV는 AAV 캡시드, 및 그 안에 포장된 벡터 게놈을 포함하고, 상기 벡터 게놈은: (a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열; (b) 프로모터; (c) 인간 TPP1을 인코딩하는 CLN2 코딩 서열; 및 (d) AAV 3' ITR을 포함한다.
- [0010] 일 양태에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 임의의 rAAV 및 약제학적 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다. 일 구현예에서, 본 조성물은 뇌실실내 (ICV) 또는 척수강내 (IT) 전달에 적합하다.
- [0011] 또 다른 양태에서, 바텐병이 있는 대상체에 대한 투여에 적합한 수성 현탁액이 제공된다. 일 구현예에서, 본 현탁액은 수성 현탁 액체 및 바텐병에 대한 치료제로 유용한 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV)의 약 7.5×10^{12} GC (7.5×10^9 GC/뇌의 그램) 내지 약 1×10^{15} GC (1×10^{12} GC/뇌의 그램) 또는 바이러스 입자를 포함하고, 상기 AAV 캡시드를 가지고 그리고 그 안에 포장된 벡터 게놈을 갖는 rAAV는: (a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열; (b) 프로모터; (c) 인간 TPP1을 인코딩하는 CLN2 코딩 서열; 및 (d) AAV 3' ITR을 포함한다.
- [0012] 또 다른 양태에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 rAAV로 바텐병이 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.
- [0013] 다른 양태 및 구현예는 본 명세서에 기재된 정보를 기초하여 쉽게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1A는 AAV.CB7.CI.hTPP1co.RBG 벡터 게놈의 도식적 표현이다. ITR은 AAV2 역전된 말단 반복을 나타낸다. CB7은 사이토메갈로바이러스 항상제를 갖는 치킨 베타 액틴 프로모터를 나타낸다. RBG 폴리A는 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호를 나타낸다.
- 도 1B는 AAV.hTPP1co 벡터의 생산 플라스미드의 맵을 제공한다.
- 도 2는 실시예 2에 기재된 바와 같이 AAV.hTPP1co 형질감염된 세포 (삼각형) 및 대조군 세포 (정사각형)의 배양 상청액에서 측정된 TPP1 효소 활성의 선 그래프이다.
- 도 3A 내지 3D는 치료가 없거나 또는 실시예 3에 기재된 바와 같이 11×10^{11} GC에서 AAV.hTPP1co의 ICV 투여로 야생형 마우스의 뇌 (도 3A), CSF (도 3B), 혈청 (도 3C) 및 간 (도 3D)에서 측정된 TPP1 효소 활성을 제공한다.
- 도 4A는 PBS 단독 (수컷, 폐쇄된 똑바른 삼각형; 암컷, 폐쇄된 역전된 삼각형), AAV.hTPP1co 벡터의 3×10^9 GC (수컷, 다이아몬드; 암컷, 개방된 원) 또는 3×10^{11} GC (수컷, 십자; 암컷, 개방 삼각형)로 처리된 TPP1 KO 마우스의 생존 치료이다. 야생형 마우스 (수컷, 폐쇄된 원; 암컷, 개방 정사각형)는 대조군으로 작용한다. 각각의

그룹에서, 수컷 및 암컷 동물 둘 모두가 모니터링되었고 잠재적 성별 차이를 나타내기 위해 별도로 기록되었다.

도 4B는 도 4A에 도시된 데이터에 기초하여 계산된 중앙 생존율을 제공한다.

도 5는 PBS 단독 (암컷, 폐쇄된 삼각형), AAV.hTPP1co의 3×10^9 GC (수컷, 개방 다이아몬드) 또는 3×10^{11} GC (수컷, 개방 정사각형; 암컷, 개방 삼각형)로 처리된 TPP1 KO 마우스의 그룹으로의 체중을 나타내는 선 그래프이다. 야생형 마우스 (수컷, 폐쇄된 원; 암컷, 폐쇄된 정사각형)는 대조군으로 작용한다.

도 6은 실시예 5에 기재된 바와 같이 PBS 단독, AAV.hTPP1co의 3×10^9 GC 또는 3×10^{11} GC로 처리된 TPP1 KO 마우스에서 시험된 운동 협응 검정의 결과를 제공한다. 야생형 마우스는 대조군으로 작용한다. 각각의 그룹에서, 수컷 및 암컷 동물 둘 모두가 시험되었고 잠재적 성별 차이를 나타내기 위해 별도로 기록되었다. 낙하 대기 시간은 장대 상에서 소비된 초 단위 시간으로 측정되었다.

도 7A는 실시예 5에 기재된 바와 같이 PBS 단독, AAV.hTPP1co의 3×10^9 GC 또는 3×10^{11} GC로 처리된 TPP1 KO 마우스의 혈청 내 항-TPP 1 항체의 생성 및 양을 도시하는 ELISA 결과이다. 야생형 마우스는 대조군으로 작용한다. 각각의 그룹에서, 수컷 및 암컷 동물 둘 모두가 시험되었고 잠재적 성별 차이를 나타내기 위해 별도로 기록되었다. 측정된 광학 밀도 (OD)는 y 축에 플롯팅되었다. 더 높은 OD 값은 더 큰 양의 항-TPP 1 항체를 나타낸다.

도 7B는 실시예 5에 기재된 바와 같이 PBS 단독, AAV.hTPP1co의 3×10^9 GC 또는 3×10^{11} GC로 처리된 TPP1 KO 마우스의 혈청 내에서 시험된 TPP1 효소 활성의 결과를 제공한다. 야생형 마우스는 대조군으로 작용한다. 각각의 그룹에서, 수컷 및 암컷 동물 둘 모두가 시험되었고 잠재적 성별 차이를 나타내기 위해 별도로 기록되었다.

도 8은 실시예 5에 기재된 바와 같이 TPP1 KO 마우스 뿐만 아니라 야생형 마우스의 측면 심실 (LV), 해마 및 시상의 일부를 포함하는 뇌 부문에서 시험된 TPP1 효소 활성의 결과를 제공한다. 0.1 내지 10 μ g의 BSA가 음성 대조군으로 이용되었다.

도 9는 실시예 5에 기재된 바와 같이 PBS 단독 또는 AAV.hTPP1co의 3×10^{11} GC가 주입된 TPP1 KO 마우스, 및 PBS 단독으로 주입된 야생형 마우스의 뇌 부문 (측면 심실 (LV), 해마 및 시상의 일부를 포함한, LV 부문으로 라벨링됨)뿐만 아니라 소뇌 및 간에서 시험된 TPP1 효소 활성의 결과를 제공한다.

도 10은 실시예 4에 기재된 바와 같이 PBS 단독 또는 AAV.hTPP1co의 1×10^{11} GC로 처리된 TPP1 KO 및 야생형 마우스의 혈청에서 시험된 TPP1 효소 활성의 결과를 제공한다.

도 11은 실시예 4에 기재된 바와 같이 PBS (KO + PBS, n=3) 또는 AAV.hTPP1co의 1×10^{11} GC (KO + 1e11 GC, n=5)가 주입된 KO 마우스의 체중을 제공한다.

도 12A는 실시예 4에 기재된 바와 같이 PBS 단독 (KO + PBS, n=4) 또는 AAV.hTPP1co의 1×10^{11} GC (KO + 1e11GC, n=4)로 처리된 TPP1 KO 마우스에서 시험된 요동 로타로드 검정의 결과를 제공한다. 낙하 대기 시간은 장대 상에서 소비된 초 단위 시간으로 측정되었다.

도 12B 및 12C는 실시예 4에 기재된 바와 같이 주사의 일 (D0)에 시작하는 테스트 또는 주사후 60일 (D60)에 시작하는 테스트에서 PBS 단독 (KO + PBS, n=4) 또는 AAV.hTPP1co의 1×10^{11} GC (KO + 1e11GC, n=4)로 처리된 TPP1 KO 마우스에서 시험된 가속 로타로드 검정의 결과를 제공한다. 낙하 대기 시간은 장대 상에서 소비된 초 단위 시간으로 측정되었다.

도 13A 및 13B는 TPP1 서열의 서열번호: 2 (천연) 및 서열번호: 3 (코돈 최적화됨)의 정렬을 제공한다.

도 14는 CLN2의 AAVrh10 벡터-기반 전달이 CLN2-/- 마우스 (CLN2 질환의 Tpp1tm1Pl0b 마우스 모델)에서 생존을 연장한다는 것을 입증한다. 도면은 Sondhi 등, 2008로부터 재생산했다.

도 15는 Tpp1mlj 마우스 ('KO'로 표시됨; n=60) 및 야생형 한배새끼 대조군 (n=40)의 생존 곡선을 도시한다. 중앙 생존은 수컷 및 암컷 각각에 대해 16 및 19 주인 것으로 관측되었다. 수컷에서의 조기 사망은 우리 싸움으로 -유도된 발작에 기인하였다.

도 16A 내지 16B는 1개월령 및 3개월령의 Tpp1mlj (KO) 및 야생형 한배새끼 (WT)에서의 TPP1 효소 활성을 도시

한다 (간, 도 16A; 및 대뇌, 도 16B). 암컷 동물에 대한 데이터는 청색으로 표시되어 있고; 수컷 동물에 대한 데이터는 흑색으로 표시되어 있다.

도 17은 1-개월령의 초기 (증상-전) Tpp1m1j 마우스의 피질 및 해마에서 관측된 진행성 별아교세포증을 도시한다. 결과 (GFAP 점수)는 20x 파워 필드당 별아교세포의 평균 수이다. *** 짝지워 지지 않은 만 휘트니 테스트.

도 18A 및 18B는 신경행동 평가를 제공한다. 도 18A: 주사 후 11주에서, 운동 협응 검정은 저-용량 또는 처리되지 않은 TPP1m1 J 대조군 동물에 대해서가 아닌, 고-용량 동물에 대한 표현형의 정정을 시사한다. 운동 협응은 요동 로타로드 (10rpm, 회전 마다 방향 전환) 상에서 180초 시도 동안 기록된 낙하 대기 시간에 상관된다. 도 18B: 주사 후 20주에서, 생존한 동물에 대해 수행된 운동 학습 검정은 WT 대조군과 고-용량 동물 사이에 차이를 나타내지 않았다. 운동 학습은 3 연속적인 일 (300초에 5 내지 40 rpm) 가속 로타로드 상에서 기록된 낙하 대기 시간에 상관된다. 도면에 묘사된 용량 수준은 동물당 총/GC에 기초하고 7.5 x 10⁹ 및 7.5 x 10¹¹ GC/g 뇌 질량에 상당한다. 짝지워 지지 않은 만 휘트니 테스트에 의한 P-값.

도 19 및 20은 생존한 동물에서의 주사후 30주 (34주령)에서 뇌 및 간 내 TPP1 효소적 활성을 입증한다. 도 19: WT 및 고-용량 동물 (분석을 위해 생존한 저-용량 동물은 없었음). 도 20: AAV9.CB7.TPP1의 투여 후 증가된 TPP1 효소적 활성. 고-용량 동물에서, TPP1 효소적 활성은 주사후 30주에서 대뇌, 소뇌, 및 간에서 과생리적 수준으로 증가되었다. M=수컷; F=암컷; WT=야생형 한배새끼.

도 21A 내지 21C는 고-용량 및 Tpp 1m1J 마우스 (주사후 30주; 라벨링된 7.5mo) 및 대조군 동물 (15주령; 라벨링된 3mo)의 뇌에서 별아교세포증의 정정을 입증한다. TPP1 KO 마우스에는 실시예 5에서 기재된 바와 같이 PBS 단독 또는 AAV.hTPP1co의 3 x 10¹¹ GC가 주입되었을뿐만 아니라 야생형 마우스에는 PBS 단독이 주입되었다. GFAP 점수는, 비히클 대조군 동물이 연구의 종단에 생존하지 않았기 때문에, 고-용량 그룹에서 동물의 뇌의 3개 상이한 일부 (해마 - 도 21A; 피질 - 도 21B; 뇌간 - 도 21C)에서 확립되었고 천연 이력 연구로부터 15-주령 Tpp1m1j 대조군 마우스에서 GFAP 점수와 비교되었다. x20 파워 필드당 별아교세포의 평균 수로 제시된 데이터. 짝지워 지지 않은 만 휘트니 테스트에 의한 P-값.

도 22A 및 22B는 3x10¹¹ GC AAV9.CB7.hTPP1co의 뇌심실내 주사로 처리된 KO 마우스의 증가된 생존을 입증한다. 모든 비히클 처리된 KO 동물은 19주의 연령 이전에 사망 또는 인도적으로 안락사된 것으로 밝혀진 반면에 벡터 처리된 암컷 (KO 3e11 F)의 67% 및 벡터 처리된 수컷 (KO 3e11 M)의 57%는 계획된 23주 종점에서 생존하였다. **** 로그-순위 Mantel-Kox 테스트, p<0.0001. 도 22A는 성별 및 치료에 의해 그룹화된 생존을 도시한다. 도 22B는 성별이 조합된 생존을 도시한다.

도 23A 및 23B는 도 22A 및 B에서와 같이 처리된 마우스에서의 매주 평균 체중을 도시한다. 비히클-처리된 KO 마우스는 주사 6주 후에 체중이 감소하기 시작했다. 벡터-처리된 동물은 희생될 때까지 그 체중을 유지하였다.

도 24는 도 22A 및 22B에서와 같이 처리된 마우스에서의 매주 평균 야간 운동을 도시한다. 매주 평균 야간 운동 속도 모니터링은 임상 증상의 개시 전 치료적 효능을 보여준다. 비교는 R 프로그램 내에서 선형 혼합된 효과 모델링을 사용하여 수행되었다. 분석은 성별에 의해 계층화되지 않았다. 통계적 유의도는 0.05 수준에서 평가되었다. KO 동물에서의 치료 효과는 Vium Day 40 (주사 후 7.7주; 14.7주령)부터 상당하였다.

도 25A 및 25B는 신경염증이 처리된 KO 마우스에서 감소됨을 입증한다. (A) 10X 필드당 피질 별아교세포 평균 계수. 검은 기호 암컷, 개방 기호 수컷. 죽은 것으로 밝혀진 동물은 자기분해로 인해 배제되었다. (B) 항-GFAP 항체를 사용한 별아교세포의 대표적인 면역염색.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 NCL의 치료를 위해 이를 필요로 하는 대상체에게 인간 트리펩티딜 펩티다아제 1 (TPP1) 단백질을 인코딩하는 CLN2 핵산 서열을 전달하는 조성물 및 방법을 포함한다. 일 구현예에서, 이러한 조성물은 CLN2 코딩 서열, 예컨대 서열번호: 3에 도시된 것의 코돈 최적화를 포함한다. 보다 낮은 용량의 시약이 사용될 수 있기 때문에, 생성물의 효능을 증가시키고, 따라서, 안전성을 증가시키는 것이 바람직하다. 서열번호: 2에 나타난 바와 같이 천연 CLN2 코딩 서열을 포함하는 조성물이 또한 본 명세서에 포괄된다.

[0016] CLN2로도 알려져 있는 TPP1 유전자는 트리펩티딜-펩티다아제 I 활성을 갖는 리소좀 세린 프로테아제인 트리펩티딜-펩티다아제 1을 인코딩한다. 이것은 또한 리소좀 프로테이나제에 의해 생성된 분해 생성물로부터 트리펩타이드를 생성하고 비치환된 N-말단을 갖는 기질을 필요로 하는 비-특이적 리소좀 펩티다아제로서 작용하는 것으로

생각된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "TPP1", "CLN2", 및 "트리펩티달-펩티다아제 1"은 코딩 서열을 언급할 때 상호교환적으로 사용된다. 인간 트리펩티달-펩티다아제 1을 인코딩하는 천연 핵산 서열은 NCBI 참조 서열 NM_000391.3에 보고되어 있고 서열번호: 2로 여기서 재생산된다. 인간 트리펩티달-펩티다아제 1의 2개 동형체는 UniProtKB/Swiss-Prot Accessions 014773-1 및 014773-2로 보고되었다 (서열번호: 1 및 4로 여기서 재생산됨). CLN2 유전자에서의 돌연변이는 후기-유아의 NCL (LINCL) 질환과 연관된다.

[0017] 때때로 본 명세서에서 AAV9.CB7.hCLN2로 지칭되는 예시적인 AAV.hTPP1co 벡터가 본 명세서에서 기재된다. 이들 용어들의 사용은 교환가능하다. 또한, 일 구현예에서, AAV9.CB7.hCLN2 벡터가 언급되는 경우, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 성분을 이용하는 대안적인 구현예가 고려된다.

[0018] 본 발명의 특정 구현예에서, 대상체는 신경 세로이드 지질갈색소증 (NCL)을 가지며, 본 발명의 성분, 조성물 및 방법은 이를 치료하기 위해 설계된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이 인간, 수의과 또는 농장 동물, 가축 또는 애완동물, 및 임상 연구에 정상적으로 사용된 동물을 포함한 포유동물의 동물을 의미한다. 일 구현예에서, 이들 방법 및 조성물의 대상체는 인간이다. 또 다른 적합한 대상체는, 비제한적으로, 쥐과, 랫트, 개과, 고양이, 돼지, 소과, 양, 비-인간 영장류 및 기타를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 "환자"와 교환가능하게 사용된다.

[0019] 신경 세로이드-지질갈색소증 (NCL)은 진행성 지적 및 운동 악화, 발작, 및 조기 사망을 특징으로 하는 선천적, 신경퇴행성, 리소좀 축적 장애의 그룹이다. 시각 손실은 대부분의 형태의 특징이다. 임상 표현형은 전통적으로 유아, 후기-유아, 유년, 성인, 및 노년 간질 (정신 지체를 갖는 진행성 간질 [EPMR]로도 알려져 있음)로의 임상 특징의 발병 연령 및 발현의 순서에 따라 특성구명되어 왔다. 그러나 유전적 및 대립유전자 불균질성이 있다; 제안된 신규한 명명법 및 분류 시스템은 책임 유전자와 질환 발병에서의 연령을 둘 모두를 고려하여 개발되었다; 예를 들어, CLN2 질환, 고전적 후기 유아. 제1 증상은, 일반적으로 간질로 시작하여 전형적으로 2세와 4세 사이에서 나타나고, 발달 이정표, 근간대 운동실조증, 및 피라미드 징후의 퇴행으로 이어진다. 시각적 손상은 전형적으로 4세 내지 6세에 나타나며 명/암 인식으로 만 빠르게 진행된다. 기대 수명은 6세에서 10대 초반까지의 범위이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "바덴병"은 "NCL"과 교환가능하게 사용되는 CLN2 질환을 지칭하는 데 사용된다.

[0020] 일 양태에서, 인간 (h) TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된, 조작된 핵산 서열이 제공된다. 특정 구현예에서, 조작된 인간 (h) TPP1 cDNA는 (서열번호: 3으로) 본 명세서에 제공되고, 이것은 천연 TPP1 서열 (서열번호: 2)에 비교하여 번역을 최대화하도록 설계되었다. 바람직하게는, 코돈 최적화된 TPP1 코딩 서열은 전장 천연 TPP1 코딩 서열 (서열번호: 2)에 대해 약 80% 마만의 동일성, 바람직하게는 약 75% 동일성 또는 그 미만을 갖는다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 TPP1 코딩 서열은 서열번호: 2의 천연 TPP1 코딩 서열과 약 74% 동일성을 갖는다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 TPP1 코딩 서열은 AAV-매개된 전달 (예를 들어, rAAV) 후 천연 TPP1에 비교할 때 개선된 번역율을 특징으로 한다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 TPP1 코딩 서열은 서열번호: 2의 전장 천연 TPP1 코딩 서열에 약 99% 미만, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61% 또는 그 미만 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 핵산 서열은 서열번호: 3의 변이체이다. 또 다른 구현예에서, 코돈 최적화된 핵산 서열은 서열번호: 3과 약 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61% 또는 그 초과 동일성을 공유하는 서열이다. 일 구현예에서, 코돈 최적화된 핵산 서열은 서열번호: 3이다. 또 다른 구현예에서, 핵산 서열은 인간에서의 발현에 대해 최적화된 코돈이다. 다른 구현예에서, 상이한 TPP1 코딩 서열이 선택된다.

[0021] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "동일성 퍼센트 (%)", "서열 동일성", "서열 동일성 퍼센트", 또는 "동일한 퍼센트"는 관련성에 대해 정렬될 때 동일한 두 서열에서의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성의 비교의 길이는 게놈의 전장, 유전자 코딩 서열의 전장 또는 적어도 약 500 내지 5000 뉴클레오타이드의 단편에 걸쳐 있을 수 있고, 요구된다. 그러나, 더 작은 단편 중, 예를 들어 적어도 약 9개 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 20 내지 24개 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 동일성이 또한 바람직할 수 있다.

[0022] 동일성 퍼센트는 단백질, 폴리펩타이드, 약 32개 아미노산, 약 330개 아미노산, 또는 펩타이드 이의 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 서열의 전장에 걸친 아미노산 서열에 대해 쉽게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 적어도 약 8개 길이의 아미노산일 수 있고, 최대 약 700개 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한

서열 간에 "동일성", "상동성", 또는 "유사성"에 대해 언급할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열에 관련하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 참조 서열에 비교될 때 염기 또는 아미노산을 누락하거나 또는 추가하는 정정을 종종 함유하는 다중 핵산 서열 또는 단백질 (아미노산) 서열을 지칭한다.

[0023] 동일성은 서열의 정렬을 하고 그리고 당업계에서 알려진 또는 상업적으로 입수가 가능한 다양한 알고리즘 및/또는 컴퓨터 프로그램 [예를 들어, BLAST, ExPASy; ClustalO; FASTA; 예를 들어, Needleman-Wunsch 알고리즘, Smith-Waterman 알고리즘을 사용함]의 사용을 통해 결정될 수 있다. 정렬은 임의의 다양한 공공연하게 또는 상업적으로 입수가 가능한 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램, 예를 들어, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램이 아미노산 서열에 대해 이용가능하다. 당해 분야의 숙련가는 필요에 따라 이들 설정을 변경할 수 있지만, 일반적으로, 임의의 이들 프로그램은 디폴트 설정에서 사용된다. 대안적으로, 당해 분야의 숙련가는 언급된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공된 것과 같은 수준의 적어도 동일성 또는 정렬을 제공하는 또 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어, J. D. Thomson 등, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999) 참고.

[0024] 핵산 서열에 대해 다중 서열 정렬 프로그램이 또한 이용가능하다. 이러한 프로그램의 예는 인터넷 상의 웹 서버를 통해 접근가능한 "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "BLAST", "MAP" 및 "MEME"를 포함한다. 이러한 프로그램의 다른 공급원이 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 대안적으로, 벡터 NTI 유틸리티가 또한 사용된다. 상기에 기재된 프로그램에 함유된 것들을 포함하여, 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하는데 사용될 수 있는 수많은 알고리즘이 또한 당업계에서 알려져 있다. 또 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta™를 사용하여 비교될 수 있다. Fasta™는 쿼리와 검색 서열 간에 최상의 겹치는 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다. 예를 들어, 핵산 서열 사이의 퍼센트 서열 동일성은 본 명세서에 참고로 편입된 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같은 그것의 디폴트 파라미터 (단어 크기 6 및 평점 매트릭스에 대한 NOPAM 인자)를 갖는 Fasta™를 사용하여 결정될 수 있다.

[0025] 코돈-최적화된 코딩 영역은 다양한 상이한 방법에 의해 설계될 수 있다. 이 최적화는 온라인으로 이용가능한 방법 (예를 들어, GeneArt), 공개된 방법, 또는 코돈 최적화 서비스, 예를 들어 DNA2.0을 제공하는 회사 (캘리포니아주 맨로 파크)를 사용하여 수행될 수 있다. 하나의 코돈 최적화 방법은, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 WO 2015/012924에 기재되어 있고, 이것은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다. 또한, 하기를 참조한다: 예를 들어, 미국 특허 공보 번호 2014/0032186 및 미국 특허 공보 번호 2006/0136184. 적합하게, 생성물에 대한 열린 해독틀 (ORF)의 전장이 변형된다. 그러나, 일부 구현예에서, ORF의 단편 만이 변경될 수 있다. 이들 방법 중 하나를 사용함으로써, 임의의 주어진 폴리펩타이드 서열에 빈도를 적용하고, 폴리펩타이드를 암호화하는 코돈-최적화된 코딩 영역의 핵산 단편을 생성할 수 있다.

[0026] 코돈에 대한 실제 변경을 수행하거나 본 명세서에서 기재된 바와 같이 설계된 코돈-최적화 코딩 영역을 합성하기 위해 다수의 옵션이 이용가능하다. 그와 같은 변형 또는 합성은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려진 표준 및 일상적인 분자 생물학적 조작을 사용하여 수행될 수 있다. 일 접근법에서, 각각 길이에서 80-90 뉴클레오타이드의 것 및 원하는 서열의 길이에 걸치는 일련의 상보적 올리고뉴클레오타이드 쌍이 표준 방법에 의해 합성된다. 이들 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링 시 응집성 단부를 함유하는 80-90 염기쌍의 이중가닥 단편을 형성하도록, 예를 들어, 쌍 내의 각각의 올리고뉴클레오타이드가 합성되어 쌍 내의 다른 올리고뉴클레오타이드에 상보적 영역을 넘어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 초과 염기로 연장되도록 합성된다. 올리고뉴클레오타이드의 각각의 쌍의 단일-가닥 단부는 또 다른 쌍의 올리고뉴클레오타이드의 단일-가닥 말단과 어닐링되도록 설계된다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링될 수 있고, 이들 이중-가닥 단편 중 대략 5 내지 6개는 그런 다음 응집성 단일가닥 단부를 통해 함께 어닐링될 수 있으며, 그 다음 이들은 함께 결합되고 표준 박테리아 클로닝 벡터, 예를 들어 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen Corporation으로부터 이용가능한 TOPO® 벡터 안으로 클로닝된다. 작제물은 그런 다음 표준 방법에 의해 서열분석된다. 함께 결합된 80 내지 90 염기쌍 단편의 5 내지 6 단편, 즉, 약 500 염기쌍의 단편으로 구성되는 이들 작제물 중 몇 개는 전체 원하는 서열이 일련의 플라스미드 작제물로 나타내도록 제조된다. 이들 플라스미드의 삽입물은 그런 다음 적절한 제한 효소로 절단되고 함께 결합되어 최종 작제물을 형성한다. 최종 작제물은 그런 다음 표준 박테리아 클로닝 벡터로 클로닝되고 서열분석된다. 추가의 방법은 숙련가에게 즉시 명백할 것이다. 또한, 유전자 합성은 상업적으로 쉽게 이용가능하다.

[0027] "조작된"은 본 명세서에 기재된 TPPI 단백질을 인코딩하는 핵산 서열이 조립되어, 예를 들어, 비-바이러스 전달 시스템 (예를 들어, RNA-계 시스템, 네이키드 DNA, 등)을 생성하기 위해 또는 패키징 숙주 세포에서 바이러스

벡터를 생성하기 위해 및/또는 대상체에서 숙주세포로 전달하기 위해, 그 위에 담지된 TPP1 서열을 숙주세포로 전달하는 임의의 적합한 유전 인자, 예를 들어, 네이키드 DNA, 파아지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜, 등에 배치되는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 유전 인자는 플라스미드이다. 이러한 조작된 작제물을 제조하기 위해 사용되는 방법은 핵산 조작에 숙련된 자에게 공지되어 있으며 유전 공학, 재조합 조작 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) 참고.

[0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주세포"는 재조합 AAV가 생산 플라스미드로부터 생산되는 포장 세포주를 지칭할 수 있다. 대안으로, 용어 "숙주세포"는 코딩 서열의 발현이 요구되는 임의의 표적 세포를 지칭할 수 있다. 따라서, "숙주세포"는 임의의 수단, 예를 들어 전기천공, 인산칼슘 침전, 미세주입, 형질전환, 바이러스성 감염, 형질감염, 리포솜 전달, 막 융합 기술, 높은 속도 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스성 감염 및 원형질 융합에 의해 세포 안으로 도입된 외인성 또는 이종성 DNA를 함유하는 원핵 또는 진핵 세포를 지칭한다. 본 명세서에서의 특정 구현예에서, 용어 "숙주세포"는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스를 생성하고 포장하는데 사용되는 세포를 지칭한다. 본 명세서에서의 다른 구현예에서, 용어 "숙주세포"는 본 명세서에 기재된 조성물의 시험관내 평가를 위한 다양한 포유동물 종의 CNS 세포의 배양을 지칭한다. 또 다른 구현예에서, 용어 "숙주세포"는 바텐병에 대해 생체내 치료되고 있는 대상체의 뇌 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 숙주세포는 뇌 심실 시스템의 상피성 내벽인 뇌실막을 포함하는 CNS의 상피 세포를 포함한다. 다른 숙주세포는 뉴런, 별아교세포, 올리고인두세포 및 미세아교세포를 포함한다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 바텐병의 하나 이상의 증상의 개선을 목적으로 본 명세서에 기재된 하나 이상의 화합물 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것으로 정의된다. "치료"는 따라서, 신경 세로이드 지질갈색소증 (NCL)의 발병 또는 진행을 감소시키는 것, 질환을 예방하는 것, 질환의 중증도 증상을 감소시키는 것, 또는 시각상실의 진행을 포함하여 그것의 진행을 지연시키는 것, 질환 증상을 제거하는 것, 주어진 대상에서 질환의 발병을 늦추거나 또는 질환의 진행 또는 치료 효능을 모니터링하는 것 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, TPP1을 인코딩하는 핵산 서열은 이에 공유결합된 태그 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산을 더 포함한다. 태그 폴리펩타이드는, 비제한적으로, myc 태그 폴리펩타이드, 글루타민-S-전달효소 태그 폴리펩타이드, 녹색 형광 단백질 태그 폴리펩타이드, myc-피루베이트 키나제 태그 폴리펩타이드, His6 태그 폴리펩타이드, 인플루엔자 바이러스 혈구응집소 태그 폴리펩타이드, 플래그 태그 폴리펩타이드, 및 말토스 결합 단백질 태그 폴리펩타이드를 포함하는 알려진 "에피토프 태그"로부터 선택될 수 있다.

[0031] 또 다른 양태에서, TPP1을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일 구현예에서, 서열은 코돈 최적화된 서열이다. 또 다른 구현예에서, 코돈 최적화된 핵산 서열은 인간 TPP1을 인코딩하는 서열번호: 3이다.

[0032] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "발현 카세트"는 TPP1 단백질에 대한 코딩 서열인 프로모터를 포함하고 그에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있는 핵산 분자를 지칭하며, 이 카세트는 바이러스 벡터(예를 들어, 바이러스성 입자)의 캡시드에 포장될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성하기 위한 이러한 발현 카세트는 본 명세서에서 기재된 것과 같은 바이러스 게놈 및 다른 발현 조절 서열의 패키징 신호에 의해 축적된 본 명세서에 기재된 CLN2 서열을 함유한다. 예를 들어, AAV 바이러스 벡터의 경우, 패키징 신호는 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 및 3' ITR이다. AAV 캡시드에 포장될 때, 발현 카세트와 공조한 ITR은 본 명세서에서 "재조합 AAV (rAAV) 게놈" 또는 "벡터 게놈"으로 지칭될 수 있다. 일 구현예에서, 발현 카세트는 TPP1 단백질을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 카세트는 숙주세포에서 TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열의 발현을 지시하는 발현 조절 서열과 작동가능하게 연관된 코돈 최적화 된 CLN2를 제공한다.

[0033] 또 다른 구현예에서, AAV 벡터에서 사용하기 위한 발현 카세트가 제공된다. 그 구현예에서, AAV 발현 카세트는 적어도 하나의 AAV 역전된 말단 반복 (ITR) 서열을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 발현 카세트는 5' ITR 서열 및 3' ITR 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 5' 및 3' ITR은, 선택적으로 숙주세포에서 TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열의 발현을 지시하는 추가의 서열과, TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 축적시킨다. 따라서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, AAV 발현 카세트는 5' AAV 역전된 말단 반복 서열 (ITR)에 의해 그것의 5' 말단 상에 그리고 3' AAV ITR에 의해 그것의 3' 말단 상에 상기에 기재된 바와 같이 축적된 발현 카세트를 기술하기 위한 것이다. 따라서, 이 rAAV 게놈은 AAV 바이러스 입자, 즉, AAV 5' 및 3' ITR 안으로 발현 카세트를 포장하기 위해 요구된 최소 서열을 함유한다. AAV ITR은 본 명세서에서 기재된 것과 같은 임의의 AAV

의 ITR 서열로부터 수득될 수 있다. 이들 ITR은 얻어진 재조합 AAV에 사용된 캡시드와 동일한 AAV 기원 또는 상이한 AAV 기원 (AAV 슈도타입을 생성하기 위함)의 것일 수 있다. 일 구현예에서, AAV2로부터의 ITR 서열 또는 이의 결실된 버전 (Δ ITR)은 편의상 그리고 규제 승인을 가속화하기 위해 사용된다. 그러나 다른 AAV 공급원으로부터 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2로부터 유래하고 AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터 유래된 경우, 얻어진 벡터는 일명 모조타이핑될 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터 계놈은 AAV 5' ITR, TPP1 코딩 서열 및 임의의 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이들 요소의 다른 배치형태가 적합할 수 있다. Δ ITR이라 불리는 5' ITR의 단축된 버전은 D-서열 및 단말 분할 부위 (trs)가 결실되는 것으로 설명되었다. 다른 구현예에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다. 각각의 rAAV 계놈은 그런 다음 생산 플라스미드에 도입될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절 서열", "전사 조절 서열" 또는 "발현 조절 서열"은 DNA 서열, 예컨대 개시제 서열, 향상제 서열, 및 프로모터 서열을 지칭하며, 이것은 이들이 작동가능하게 연결된 핵산 서열을 인코딩하는 단백질의 전사를 유도, 억제 또는 달리 제어한다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된" 또는 "작동가능하게 연관된"은 TPP1을 인코딩하는 핵산 서열과 인접하는 발현 조절 서열 및/또는 이의 전사 및 발현을 제어하기 위해 트랜스로 또는 원격으로 작용하는 발현 조절 서열을 지칭한다.

[0036] 일 양태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 발현 카세트를 포함하는 벡터가 제공된다. 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 이러한 벡터는 다양한 기원의 플라스미드일 수 있고, 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같은 재조합 복제 결합있는 바이러스의 생성에 특정 구현예에서 유용하다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "벡터"는 외인성 또는 이종성 또는 조작된 핵산 이식 유전자가 삽입될 수 있는 핵산 분자이고 이것은 그런 다음 적절한 숙주세포 내로 도입될 수 있다. 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제의 기원, 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 종종 벡터를 갖는 세포가, 예를 들어, 약물 내성 유전자를 인코딩하지 않는 세포들로부터 선택될 수 있는 수단을 갖는다. 일반적인 벡터는 플라스미드, 바이러스 계놈 및 (주로 효모 및 박테리아에서) "인공 염색체"를 포함한다. 특정 플라스미드가 본 명세서에 기재되어 있다.

[0038] 일 구현예에서, 벡터는 이들의 기재된 발현 카세트, 예를 들어, "네이키드 DNA", "네이키드 플라스미드 DNA", RNA, 및 mRNA를 포함하는 비-바이러스 플라스미드이고; 예를 들어, 교질입자, 리포솜, 양이온성 지질 - 핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 다른 폴리머, 지질 및/또는 콜레스테롤-계 - 핵산 콘주게이트, 및 본 명세서에 기재되어 있는 것과 같은 다른 작제물을 포함한 다양한 조성물 및 나노 입자와 커플링된다. 예를 들어, 이들 모두가 본 명세서에 참고로 편입되는, X. Su 등, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8(3), pp 774-787; 웹 공보: 2011년 3월 21일; WO2013/182683, WO 2010/053572 및 WO 2012/170930 참고. 그와 같은 비-바이러스 TPP1 벡터는 본 명세서에 기재된 경로에 의해 투여될 수 있다. 바이러스 벡터, 또는 비-바이러스 벡터는 유전자 전달 및 유전자 요법 적용에 사용하기 위해 생리적으로 허용가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다.

[0039] 또 다른 구현예에서, 벡터는 그 안에 기술된 발현 카세트를 포함하는 바이러스 벡터이다. "바이러스 벡터"는 외인성 또는 이종성 CLN2 핵산 이식유전자를 함유하는 복제 결합있는 바이러스로 정의된다. 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 발현 카세트는 약물 전달 또는 바이러스 벡터의 생산에 사용되는 플라스미드 상으로 조작될 수 있다. 적합한 바이러스 벡터는 바람직하게는 복제 결합 있으며 뇌 세포를 표적으로 하는 것들 중에서 선택된다. 바이러스 벡터는 비제한적으로 아데노바이러스; 헤르페스 바이러스; 렌티바이러스; 레트로바이러스; 파코바이러스, 등을 포함한, 유전자 요법에 적합한 임의의 바이러스를 포함할 수 있다. 그러나, 이해의 용이성을 위해, 아데노-연관된 바이러스가 본 명세서에서 예시적인 바이러스 벡터로서 언급된다.

[0040] "복제-결합있는 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"는 관심 유전자를 함유하는 발현 카세트가 바이러스 캡시드 또는 외피에 포장되는 합성 또는 재조합 바이러스 입자를 지칭하며, 여기서 임의의 바이러스 유전자 서열은 또한 바이러스 캡시드 내에 포장되거나 또는 외피는 복제-결핍된다; 즉, 이들은 자손 비리온을 생성할 수 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력을 유지한다. 일 구현예에서, 바이러스 벡터의 계놈은 복제하는데 필요한 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하지 않지만 (계놈은 인공 계놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호에 의해 축적된 관심 있는 트랜스유전자 만을 함유하는- "무창성"하도록 조작될 수 있음), 그러나 이들 유전자는 생산 동안 공급될 수 있다. 따라서, 그것은 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재를 제외하고는 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 발생할 수 없기 때문에 유전자 요법에 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

- [0041] 또 다른 구현예에서, 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV) 벡터가 제공된다. rAAV는 AAV 캡시드, 및 그안에 포장된 벡터 게놈을 포함한다.
- [0042] 일 구현예에서, 벡터 게놈은: (a) AAV 5' 역전된 말단 반복 (ITR) 서열; (b) 프로모터; (c) 인간 TPP1을 인코딩하는 코딩 서열; 및 (d) AAV 3' ITR을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 벡터 게놈은 본 명세서에 기재된 발현 카세트이다. 일 구현예에서, CLN2 서열은 전장 TPP1 단백질을 인코딩한다. 일 구현예에서, TPP1 서열은 서열번호: 1의 단백질 서열이다. 또 다른 구현예에서, 코딩 서열은 서열번호: 3 또는 그것의 변이체이다.
- [0043] 과보바이러스 계열의 구성원인 아데노-연관된 바이러스 (AAV)는 4.7 킬로베이스 (kb) 내지 6 kb의 단일-가닥 선형 DNA 게놈을 갖는 작은 외피를 보유하지 않은 이십면체 바이러스이다. 알려진 AAV 혈청형 중에는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 및 기타가 있다. ITR 또는 다른 AAV 성분은 AAV로부터 당해 분야의 숙련가에게 이용가능한 기술을 사용하여 용이하게 단리되거나 조작될 수 있다. 이러한 AAV는 학술적, 상업적, 또는 공공 공급원 (예를 들어, 미국 중군 협회, 버지니아주 매너서스 소재)으로부터 단리, 조작 또는 수득될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌 또는 예를 들어 GenBank, PubMed 등과 같은 데이터베이스에서 이용가능한 것과 같은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적당한 수단을 통해 조작될 수 있다. AAV 바이러스는 통상적인 분자 생물학 기술에 의해 조작될 수 있어, 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성 최소화, 안정성 및 입자 수명 조정, 효율적인 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 이들 입자를 최적화할 수 있다.
- [0044] AAV의 단편은 다양한 벡터 시스템 및 숙주세포에서 쉽게 이용될 수 있다. 바람직한 AAV 단편 중에는 vp1, vp2, vp3 및 초가변성 영역을 포함하는 cap 단백질, rep 78, rep 68, rep 52 및 rep 40을 포함하는 rep 단백질을, 및 이들 단백질을 인코딩하는 서열이 있다. 그와 같은 단편은 단독으로, 다른 AAV 혈청형 서열 또는 단편과 조합하여, 또는 다른 AAV 또는 비-AAV 바이러스 서열로부터의 요소와 조합하여 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인공 AAV 혈청형은, 비제한적으로, 비-자연 발생 캡시드 단백질을 갖는 AAV를 포함한다. 그와 같은 인공 캡시드는 본 발명의 신규한 AAV 서열 (예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 또 다른 AAV 혈청형 (알려진 또는 신규한 것), 동일한 AAV 혈청형의 비-인접 부분, 비-AAV 바이러스 원천, 또는 비-바이러스 원천으로부터 수득될 수 있는 이종성 서열과 조합으로 사용하여 임의의 적합한 기술에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV 혈청형은, 비제한적으로, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드, 또는 "인간화된" AAV 캡시드일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 AAV9 cap 및/또는 rep 서열을 함유한다. 본 명세서에 참고로 편입된, 미국 특허 번호 7,906,111 참고.
- [0045] 일 구현예에서, 서열번호: 6의 아미노산 서열을 특징으로 하는 AAV9 캡시드를 갖는 AAV 벡터가 본 명세서에 제공되며, 여기서 조절 서열의 제어하에 고전적인 후기 유아의 신경 세포이도 지질갈색소증 2 (CLN2) 유전자를 인코딩하는 핵산은 이를 필요로 하는 환자에서 이의 발현을 지시한다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "AAV9 캡시드"는 상이한 길이의 서열번호: 6의 단백질을 생성하는 대안적인 스플라이스 변이체로서 전형적으로 발현되는 약 60개의 가변성 단백질 (vp)의 어셈블리인 DNase-저항성 입자를 특징으로 한다. 또한 하기를 참조한다: 유전자는 핵 수탁 No. AAS99264.1로, 이것은 본 명세서에 참고로 편입된다. 또한 US790611 1 및 WO 2005/033321를 참고한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "AAV9 변이체"는, 예를 들어, WO2016/049230, US 8,927,514, US 2015/0344911, 및 US 8,734,809에 기재된 것들을 포함한다. 아미노산 서열은 서열번호: 6으로 재생산되고 코딩 서열은 서열번호: 7로 재생산된다. 일 구현예에서, AAV9 캡시드는 서열번호: 7에 의해 인코딩된 캡시드, 또는 이들과 적어도 약 90%, 95%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 공유하는 서열을 포함한다.
- [0047] 최대 단백질인 vp1은 일반적으로 서열번호: 6의 아미노산 서열 (서열번호: 6의 aa 1 - 736)의 전장이다. 특정 구현예에서, AAV9 vp2 단백질은 서열번호: 6의 138 내지 736의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 구현예에서, AAV9 vp3은 서열번호: 6의 203 내지 736의 아미노산 서열을 갖는다. 특정 구현예에서, vp 1, 2 또는 3 단백질은 절단 (예를 들어, N-말단 또는 C-말단에서 1 또는 그 초과 아미노산)을 가질 수 있다. AAV9 캡시드는 vp1, vp2 및 vp3이 조립된 캡시드 내에서 약 1 vp, 대 약 1 vp2, 대 약 10 내지 20 vp3 단백질의 비로 존재하는 약 60 vp 단백질로 구성된다. 이 비는 사용된 생산 시스템에 따라 다양할 수 있다. 특정 구현예에서, vp2가 부재하는 조작된 AAV9 캡시드가 생성될 수 있다.
- [0048] DNA (게놈 또는 cDNA), 또는 RNA (예를 들어, mRNA)를 포함하여 이 AAV9 캡시드를 인코딩하는 핵산 서열을 디자인하는 것은 당업계의 기술 내에 있다. 특정 구현예에서, AAV9 vp1 캡시드 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 서열번호: 7에 제공된다. 다른 구현예에서, 서열번호: 7에 70% 내지 99.9% 동일성의 핵산 서열이 선택되어 AAV9 캡시드를 발현할 수 있다. 특정 다른 구현예에서, 핵산 서열은 서열번호: 7에 적어도 약 75% 동일, 적어도 80%

동일, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 동일, 또는 적어도 99% 내지 99.9% 동일하다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, AAV의 그룹과 관련할 때 용어 "분기군"은 적어도 75%의 (적어도 1000 반복의) 부트스트랩 값에 의해 이웃-결합 알고리즘 및 AAV vp1 아미노산 서열의 정렬에 기초하여 0.05 이하의 푸와송 정정 거리 측정을 사용하여 결정된 바와 같이 서로 계통발생적으로 관련되는 AAV 그룹을 지칭한다. 이웃-결합 알고리즘은 문헌에 기술되어있다. 예를 들어, M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York (2000) 참고. 이 알고리즘을 구현하는 데 사용할 수 있는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 예를 들어, MEGA v2.1 프로그램은 변형된 Nei-Gojobori 방법을 구현한다. 이들 기술 및 컴퓨터 프로그램, 및 AAV vp 1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당해 분야의 숙련가는 선택된 AAV가 본 명세서에 확인된 분기군 중 하나에, 또 다른 분기군에 함유되어 있는지, 또는 이들 분기군의 외부에 있는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 분기군 A, B, C, D, E 및 F를 확인하고 신규한 AAV의 핵산 서열을 제공하는, G Gao, 등, *J Virol*, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388, 유전자은행 수탁 번호 AY530553 내지 AY530629 참고. 또한, WO 2005/033321 참고. AAV9는 추가로 분기군 F 내에 있는 것을 특징으로 한다. 다른 분기군 F AAV는 AAVhu31 및 AAVhu32를 포함한다.

[0050] AAV에 관하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 변이체는 아미노산 또는 핵산 서열에 대하여 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 그 초과 서열 동일성을 공유하는 것을 포함하는, 알려진 AAV 서열로부터 유래된 임의의 AAV 서열을 의미한다. 또 다른 구현예에서, AAV 캡시드는 임의의 기재된 또는 알려진 AAV 캡시드 서열로부터 최대 약 10% 변동을 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본 명세서에 제공된 및/또는 당업계에서 알려진 AAV 캡시드에 약 90% 동일성 내지 약 99.9% 동일성, 약 95% 내지 약 99% 동일성 또는 약 97% 내지 약 98% 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드와 적어도 95% 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 동일성 퍼센트를 결정할 때, 비교는 임의의 가변성 단백질 (예를 들어, vp1, vp2, 또는 vp3)에 대해 될 수 있다. 일 구현예에서, AAV 캡시드는 vp 1, vp2 또는 vp3에 대해 AAV9와 적어도 95% 동일성을 공유한다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "인공 AAV"는, 비제한적으로, 비-자연 발생 캡시드 단백질을 갖는 AAV를 의미한다. 그와 같은 인공 캡시드는 상이한 선택된 AAV, 동일한 AAV의 비-인접 부분, 비-AAV 바이러스 원천, 또는 비-바이러스 원천으로부터 수득될 수 있는 이중성 서열과 조합하여 선택된 AAV 서열 (예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)를 사용하여, 임의의 적합한 기술에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는, 비제한적으로, 모조타이핑된 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드, 또는 "인간화된" AAV 캡시드일 수 있다. 일 AAV의 캡시드가 이중성 캡시드 단백질로 대체된 모조타이핑된 벡터가 본 발명에서 유용하다. 일 구현예에서, AAV2/9 및 AAV2/rh.10은 예시적인 모조타이핑된 벡터이다.

[0052] 또 다른 구현예에서, 자기-상보적 AAV가 사용된다. "자기-상보적 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해 운반되는 코딩 영역이 분자내 이중-가닥 DNA 템플레이트를 형성하도록 설계된 발현 카세트를 갖는 플라스미드 또는 벡터를 지칭한다. 감염시, 제2 가닥의 세포 매개된 합성을 기다리는 대신에, scAAV의 2개의 상보적 절반은 즉각적인 복제 및 전사가 준비된 1개 이중가닥 DNA (dsDNA) 단위를 형성하도록 회합될 것이다. 예를 들어, D M McCarty 등, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, 1248-1254 면 참고. 자기-상보적 AAV는, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,596,535; 7,125,717; 및 7,456,683에 기재되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다.

[0053] 핵산 서열 또는 단백질을 기술하기 위해 사용된 용어 "외인성"은 핵산 또는 단백질이 염색체, 또는 숙주세포에서 그것이 존재하는 위치에서 자연적으로 발생하지 않는다는 것을 의미한다. 외인성 핵산 서열은 또한 동일한 숙주세포 또는 대상체로부터 유래되고 그 안으로 삽입되지만, 비-천연 상태, 예를 들어 상이한 복제수로, 또는 상이한 조절 인자의 제어 하에 존재하는 서열을 지칭한다.

[0054] 핵산 서열 또는 단백질을 기술하기 위해 사용된 용어 "이중성"은 핵산 또는 단백질이 그것이 발현되는 숙주세포 또는 대상체와 상이한 유기체 또는 동일한 유기체의 상이한 종으로부터 유래되었다는 것을 의미한다. 플라스미드, 발현 카세트 또는 벡터에서 단백질 또는 핵산과 관련하여 사용될 때 용어 "이중성"은 단백질 또는 핵산이 문제의 단백질 또는 핵산이 본질적으로 서로에 대해서 동일한 관계로 발견되지 않는 또 다른 서열 또는 하위서열로 존재한다는 것을 나타낸다.

[0055] 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하는 발현 카세트는 재조합 AAV 계통을 생성하는데 이용된다.

- [0056] 일 구현예에서, 본 명세서에 기재된 발현 카세트는 바이러스 벡터를 생성하는데 및/또는 숙주세포로 전달하는데 유용한 적합한 유전 인자 (벡터), 예를 들어 네이키드 DNA, 파아지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜, 등으로 조 작되며, 이는 그 위에 운반되는 CLN2 서열을 전달한다. 선택된 벡터는 형질감염, 전기천공, 리포솜 전달, 막 용 합 기술, 높은 속도 DNA-코팅된 펠렛, 바이러스성 감염 및 원형질 용합을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 이러한 작제물을 제조하는데 사용되는 방법은 핵산 조작 숙련자에게 공지되어 있으며 유전공학, 재조합 조작, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 참고.
- [0057] 비리온 안으로 발현 카세트 또는 rAAV 게놈 또는 생산 플라스미드를 패키징하기 위해, ITR은 발현 카세트와 동 일한 작제물에서 시스에 요구된 유일한 AAV 성분이다. 일 구현예에서, 복제 (rep) 및/또는 캡시드 (cap)에 대한 코딩 서열은 AAV 게놈으로부터 제거되고 AAV 벡터를 생성하기 위해 트랜스로 또는 포장 세포주에 의해 공급된다.
- [0058] 대상체에게 전달하기에 적합한 AAV 바이러스 벡터를 생성 및 분리하는 방법은 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, US 특허 7790449; US 특허 7282199; WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/1 10689; 및 US 7588772 B2 참고. 일 시스템에서, 생산자 세포주는 ITR에 의해 축적된 이식유전자를 인코딩하는 작제물 및 rep와 cap를 인코딩하는 작제물(들)로 일시적으로 형질감염된다. 제2 시스템에서, rep 및 cap를 안정적으로 공급하는 포장 세포주는 ITR에 의해 축적된 이식유전자를 인코딩하는 작제물로 일시적으로 형질감염된다. 이들 각각의 시스템 에서, AAV 비리온은 헬퍼 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스로 감염에 반응하여 생성되며, rAAV를 오염 바 이러스로부터 분리해야 한다. 더욱 최근에는 AAV를 회수하기 위해 헬퍼 바이러스에 감염되지 않는 시스템이 개 발되었다 - 요구된 헬퍼 기능 (즉, 아데노바이러스 E1, E2a, VA, 및 E4 또는 헤르페스바이러스 UL5, UL8, UL52, 및 UL29, 및 헤르페스바이러스 중합효소)은 또한 시스템에 의해 트랜스로 공급된다. 이들 새로운 시스템에서, 요구된 헬퍼 기능을 인코딩하는 작제물로 세포의 일시적 형질감염에 의해 헬퍼 기능이 공급될 수 있거나, 또는 세포가 헬퍼 기능을 인코딩하는 유전자를 안정적으로 함유하도록 조작될 수 있으며, 그 발현은 전사 또는 후전 사 수준으로 제어될 수 있다.
- [0059] 용어 "단리된"은 물질이 그것의 최초 환경 (예를 들어, 자연 발생의 경우 자연 환경)으로부터 제거됨을 의미한 다. 예를 들어, 살아있는 동물에 존재하는 자연적으로-발생하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리 되지 않지만, 자연계에 공존하는 물질 중 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩 타이드는 후속으로 자연계로 재도입 되더라도 단리된다. 그와 같은 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있 고 및/또는 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 조성물의 일부일 수 있으며, 이러한 벡터 또는 조 성물이 그것의 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리된다.
- [0060] 여전히 또 다른 시스템에서, ITR 및 rep/cap 유전자에 의해 축적된 발현 카세트는 배컬로바이러스-계 벡터로 감 염에 의해 곤충 세포 안으로 도입된다. 이들 생산 시스템에 대한 검토는, 일반적으로, 예를 들어, Zhang 등, 2009, "Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production", Human Gene Therapy 20:922-929를 참고하고, 그 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다. 이들 및 다른 AAV 생산 시스템을 제조하고 사용하는 방법은 또한 다음의 미국 특허에 기재되어 있으 며, 이들 각각의 내용은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된다: 5,139,941; 5,741,683; 6,057, 152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7, 172,893; 7,201,898; 7,229,823; 및 7,439,065. 일반적으로, 예를 들어, Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning 등, 2008, "Recent developments in Adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733; 및 하기에 인용된 참조문헌을 참고하고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입된 다.
- [0061] 본 발명의 임의의 구현예를 구성하는데 사용된 방법은 핵산 조작에 숙련된 자에게 공지되어 있으며 유전공학, 재조합 조작, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, Green and Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) 참고. 유사하게, rAAV 비리 온을 생성하는 방법이 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대한 제한이 아니다. 예를 들어, K. Fisher 등, (1993) J. Virol, 70:520-532 및 미국 특허 번호 5,478,745 참고.
- [0062] "플라스미드"는 일반적으로 당해 분야의 숙련자에게 친숙한 표준 명명 규칙에 따라, 소문자 p 앞에 선행되고 및 /또는 이어서 대문자 및/또는 숫자에 의해 본 명세서에서 지칭된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 많은 플라

스미드 및 다른 클로닝 및 발현 벡터가 잘 알려져 있으며 당해 분야의 숙련자에게 쉽게 이용가능하다. 나아가, 당업자는 본 발명에서 사용하기에 적합한 임의의 수의 다른 플라스미드를 쉽게 구축할 수 있다. 본 발명에서 이러한 플라스미드뿐만 아니라 드 다른 벡터의 특성, 구성 및 사용은 본 개시내용으로부터 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

[0063] 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 본 명세서에 기재되거나 또는 W02012/158757에 기재된 것과 같으며, 이는 본 명세서에 참고로 편입된다. rAAV 벡터를 생성하는데 사용하기 위한 다양한 플라스미드가 당해 기술에 공지되어 있고, 본 명세서에서 유용하다. 생산 플라스미드는 AAV cap 및/또는 rep 단백질을 발현하는 숙주세포에서 배양된다. 숙주세포에서, 각각의 rAAV 게놈은 구조되고 캡시드 단백질 또는 외피 단백질로 포장되어 감염성 바이러스 입자를 형성한다.

[0064] 일 양태에서, 상기에 기재된 발현 카세트를 포함하는 생산 플라스미드가 제공된다. 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 도 1B에 도시된 것이다. 이 플라스미드는 rAAV-인간 코돈 최적화된 TPP1 벡터의 생성을 위한 실시예에서 사용된다. 그와 같은 플라스미드는 5' AAV ITR 서열; 선택된 프로모터; 폴리A 서열; 및 3' ITR을 함유하는 것이고; 추가로, 인트론 서열, 예컨대 치킨 베타-액틴 인트론을 또한 함유한다. 예시적인 개략도가 도 1A에 도시되어 있다. 추가 구현예에서, 인트론 서열은 rAAV 벡터 게놈을 약 3 킬로베이스 (kb) 내지 약 6 kb, 약 4.7 kb 내지 약 6 kb, 약 3 kb 내지 약 5.5 kb, 또는 약 4.7 kb 내지 5.5 kb의 크기로 유지한다. TPP1 인코딩 서열을 포함하는 생산 플라스미드의 예는 서열번호: 5에서 발견될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 생산 플라스미드는 최적화된 벡터 플라스미드 생산 효율로 변형된다. 이러한 변형은 다른 중성 서열의 첨가 또는 벡터 플라스미드의 슈퍼코일의 수준을 조절하기 위한 램다 스태퍼 서열의 봉입을 포함한다. 이러한 변형은 본 명세서에서 고려된다. 다른 구현예에서, 종결자 및 다른 서열이 플라스미드에 포함된다.

[0065] 특정 구현예에서, rAAV 발현 카세트, 벡터 (예컨대 rAAV 벡터), 바이러스 (예컨대 rAAV), 및/또는 생산 플라스미드는 AAV 역전된 말단 반복 서열, TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열, 및 숙주세포에서 인코딩된 단백질의 발현을 지시하는 발현 조절 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, rAAV 발현 카세트, 바이러스, 벡터 (예컨대 rAAV 벡터), 및/또는 생산 플라스미드는 인트론, 코작 서열, 폴리A, 후전사 조절 인자 및 기타 중 하나 이상을 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 후전사 조절 인자는 우드치크 간염 바이러스 (WHP) 후전사 조절 인자 (WPRE)이다.

[0066] 발현 카세트, 벡터 및 플라스미드는, 예를 들어, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 코돈 최적화를 포함하여, 당 업계에서 알려진 기술을 사용하여 특정 종에 대해 최적화될 수 있는 다른 성분을 포함한다. 본 명세서에 기재된 카세트, 벡터, 플라스미드 및 바이러스 또는 다른 조성물의 성분은 발현 조절 서열의 일부로서 프로모터 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 프로모터는 세포 특이적이다. 용어 "세포 특이적"은 재조합 벡터에 대해 선택된 특정 프로모터가 특정 세포 또는 조직 유형에서 최적화된 TPP1 코딩 서열의 발현을 지시할 수 있다는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 프로모터는 뇌 심실 시스템의 상피성 내벽인 뇌실막에서의 이식유전자의 발현에 특이적이다. 또 다른 구현예에서, 프로모터는 뉴런, 별아교세포, 올리고두중세포 및 미세아교세포로부터 선택된 뇌 세포에서의 발현에 특이적이다. 일 구현예에서, 프로모터는 클로닝을 용이하게하기 위해 하나 이상의 제한 부위를 부가하도록 변형된다.

[0067] 또 다른 구현예에서, 프로모터는 도처에 존재하거나 또는 구성적인 프로모터이다. 적합한 프로모터의 예는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 향상제 요소를 갖는 하이브리드 치킨 β -액틴 (CBA) 프로모터, 예컨대 nt 3396 내지 4061에서 서열번호: 5로 나타낸 서열이다. 또 다른 구현예에서, 프로모터는 CB7 프로모터이다. 다른 적합한 프로모터는 인간 β -액틴 프로모터, 인간 연신 인자-1 α 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 유인원 바이러스 40 프로모터, 및 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제 프로모터를 포함한다. 예를 들어, Damdindorj 등, (August 2014) A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors. PLoS ONE 9(8): e106472 참고. 또 다른 적합한 프로모터는 바이러스 프로모터, 항시성 프로모터, 조절 가능 프로모터를 포함한다 [예를 들어, WO 201 1/126808 및 WO 2013/04943 참고]. 대안적으로 생리적 신호에 반응하는 프로모터는 본 명세서에 기재된 발현 카세트, rAAV 게놈, 벡터, 플라스미드 및 바이러스에 이용될 수 있다. 일 구현예에서, 프로모터는 AAV 벡터의 크기 제한으로 인해 1000 bp 아래의 작은 크기의 것이다. 또 다른 구현예에서, 프로모터는 400 bp 미만이다. 다른 프로모터는 당해 분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있다.

[0068] 추가 구현예에서, 프로모터는 하기로부터 선택된다: SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, 파아지 램다 (PL) 프로모터, 단순 포진 바이러스 (HSV) 프로모터, 테트라사이클린-제어된 트랜스-활성제-반응성 프로모터 (tet) 시스템, 긴 말단 반복 (LTR) 프로모터, 예컨대 RSV LTR, MoMLV LTR, BIV LTR 또는 HIV LTR, 물

로니 컷과 육종 바이러스의 U3 영역 프로모터, 그란자임 A 프로모터, 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열(들), CD34 프로모터, CD8 프로모터, 티미딘 키나제 (TK) 프로모터, B19 파보바이러스 프로모터, PGK 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 열충격 단백질 (HSP) 프로모터, 예컨대 HSP65 및 HSP70 프로모터, 면역글로불린 프로모터, MMTV 프로모터, 루 육종 바이러스 (RSV) 프로모터, lac 프로모터, CaMV 35S 프로모터, 노팔라인 합성효소 프로모터, MND 프로모터, 또는 MNC 프로모터. 이들의 프로모터 서열은 당해 분야의 숙련자에게 알려져 있거나 또는 문헌에서 또는 데이터베이스, 예를 들어, GenBank, PubMed, 등에서와 같이 공개적으로 이용가능하다.

[0069] 또 다른 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 유도성 프로모터는 라파마이신/라팔로그 프로모터, 엑디손 프로모터, 에스트로겐-반응성 프로모터, 및 테트라사이클린-반응성 프로모터, 또는 헤테로이량체성 억제인자 스위치를 포함한 알려진 프로모터로부터 선택될 수 있다. 다음 둘 모두가 본 명세서에 전체적으로 참고로 편입되는, Sochor 등, An Autogenously Regulated Expression System for Gene Therapeutic Ocular Applications. Scientific Reports, 2015 Nov 24;5: 17105 및 Daber R, Lewis M., A novel molecular switch. J Mol Biol. 2009 Aug 28;391(4):661-70, Epub 2009 Jun 21 참고.

[0070] 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 발현 카세트, 벡터, 플라스미드 및 바이러스는 다른 적절한 전사 개시, 종결, 향상제 서열, 효율적인 RNA 처리 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리 A) 신호; TATA 서열; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 고양하는 서열 (즉, Kozak 공통 서열); 인트론; 단백질 안정성을 고양하는 서열; 및 원할 때, 인코딩된 생성물의 분비를 고양하는 서열을 함유한다. 발현 카세트 또는 벡터는 본 명세서에 기재된 임의의 요소를 함유하지 않거나 그 중 하나 이상을 함유할 수 있다.

[0071] 적합한 폴리A 서열은, 예를 들어, 합성 폴리A 또는 소과 성장 호르몬 (bGH), 인간 성장 호르몬 (hGH), SV40, 토끼 β -글로빈 (RGB), 또는 변형된 RGB (mRGB)로부터의 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 폴리 A는 서열번호: 5의 nt 33 내지 159로부터의 핵산 서열을 갖는다.

[0072] 적합한 향상제의 예는 기타들 중에서도, 예를 들어, CMV 향상제, RSV 향상제, 알파 태아단백 향상제, TTR 최소 프로모터/향상제, LSP (TH-결합 글로불린 프로모터/알파 1-마이크로글로불린/비쿠닌 향상제), APB 향상제, ABPS 향상제, 알파 mic/bik 향상제, TTR 향상제, en34, ApoE를 포함한다.

[0073] 일 구현예에서, 코작 서열은 정확한 개시 코돈으로부터의 번역을 향상시키기 위해 TPP1 코딩 서열의 업스트림에 포함된다. 또 다른 구현예에서, CBA 엑손 1 및 인트론이 발현 카세트에 포함된다. 일 구현예에서, TPP1 코딩 서열은 하이브리드 치킨 β 액틴 (CBA) 프로모터의 제어하에 배치된다. 이 프로모터는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 전초기 향상제, 근위 치킨 β 액틴 프로모터 및 인트론 1 서열에 의해 측정된 CBA 엑손 1로 구성된다.

[0074] 또 다른 구현예에서, 인트론은 하기로부터 선택된다: CBA, 인간 베타 글로빈, IVS2, SV40, bGH, 알파-글로불린, 베타-글로불린, 콜라겐, 난백알부민, p53, 또는 이의 단편.

[0075] 일 구현예에서, 발현 카세트, 벡터, 플라스미드 및 바이러스는 5' ITR, 치킨 베타-액틴 (CBA) 프로모터, CMV 향상제, CBA 엑손 1 및 인트론, 인간 코돈 최적화된 CLN2 서열, 토끼 글로빈 폴리 A 및 3' ITR을 함유한다. 추가 구현예에서, 발현 카세트는 서열번호: 9의 nt 1 내지 4020을 포함한다. 또 추가의 구현예에서, 5' ITR은 서열번호: 5의 nt 3199 내지 nt 3328의 핵산 서열을 가지고 3' ITR은 서열번호: 5의 nt 248 내지 nt 377의 핵산 서열을 갖는다. 추가 구현예에서, 생산 플라스미드는 서열번호: 5의 서열을 가지고, 또한 도 1C-1E에 도시되어 있다.

[0076] 또 다른 양태에서, CLN2 유전자에서의 결함에 의해 야기된 바텐병을 치료하는 방법은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 TPP1을 인코딩하는 벡터 (예컨대 rAAV)를 그것을 필요로 하는 대상체에게 전달하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 바텐병이 있는 대상체를 본 명세서에 기재된 rAAV로 치료하는 방법이 제공된다.

[0077] 본 방법에 사용될 때 "투여하는 것"은 CLN2 유전자에서의 결함을 특징으로 하는 표적 선택된 세포에 조성물을 전달하는 것을 의미한다. 일 구현예에서, 본 방법은 척수강내 주사에 의해 조성물을 전달하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 대상체에 대한 ICV 주사가 이용된다. 또 다른 구현예에서, 대상체에 대한 척수강내-요추 (IT-L) 주사가 이용된다. 또 다른 방법에서, 혈관내 주사가 이용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 근육내 주사가 이용된다. 또 다른 투여 방법은 본 개시내용에 제공된 당해 분야의 숙련가에 의해 선택될 수 있다.

[0078] "투여하는 것" 또는 "투여 경로"는 대상체의 약제학적 담체 또는 부형제와 함께 또는 없이 본 명세서에 기재된 조성물의 전달이다. 요망하는 경우, 투여 경로는 조합될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 주기적으로 반복된다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달되도록 설계된다. 일부 구현예에서, 뇌로의 직접적인 전달 (선택적으로 척수강내, ICV 또

는 IT-L 주사를 포함) 또는 전신 경로를 통한 전달, 예를 들어 혈관내, 동맥내, 안내내, 정맥내, 근육내, 피하, 진피내 및 다른 투여의 친계 경로가 이용된다. 본 명세서에 기재된 핵산 분자, 발현 카세트 및/또는 벡터는 단일 조성물 또는 다중 조성물로 전달될 수 있다. 선택적으로, 2개 또는 그 초과 상이한 AAV가 전달될 수 있거나, 또는 다중 바이러스가 전달될 수 있다 [예를 들어, WO20 201 1/126808 및 WO 2013/049493 참고]. 또 다른 구현예에서, 다중 바이러스는 단독으로 또는 단백질과 조합하여, 상이한 복제-결합있는 바이러스 (예를 들어, AAV 및 아데노바이러스)를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "척수강내 전달" 또는 "척수강내 투여"는 뇌척수액 (CSF)에 도달하도록 척추관, 더 구체적으로 지주막하 공간 안으로 주사를 통한 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다. 척수강내 전달은 요추 천자, 심실내 (뇌심실내 (ICV)를 포함함), 후두엽/낭내, 및/또는 C 1-2 천자를 포함 할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자의 수단에 의해 지주막하 공간 전반에 걸친 확산을 위해 도입될 수 있다. 또 다른 예에서, 주사는 대수조 안으로 될 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어들 "낭내 전달" 또는 "낭내 투여"는 대수조 소뇌의 뇌척수액 안으로, 더 구체적으로 후두엽 천자를 통해 또는 대수조 내로의 직접적인 주사에 의하거나 또는 영구적으로 배치된 튜브를 통해, 직접적으로 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다. 본 명세서에 기재된 조성물을 뇌척수액 안으로 전달하는 데 유용한 장치는 PCT/US2017/16133에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0080] 약제학적 조성물이 또한 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달되도록 설계된다.

[0081] 또 특정 다른 양태에서, 이들 핵산 서열, 벡터, 발현 카세트 및 rAAV 바이러스 벡터는 또한 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제, 완충액, 희석제, 계면활성제, 보존제 및/또는 아췌반트 등을 포함하는 약제학적 조성물에서 유용하다. 그와 같은 약제학적 조성물은 이러한 재조합으로 조작된 AAV 또는 인공 AAV에 의한 전달을 통해 숙주세포에서 최적화된 TPP1을 발현하기 위해 사용된다.

[0082] 핵산 서열, 벡터, 발현 카세트 및 rAAV 바이러스 벡터를 함유하는 이들 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 서열 또는 벡터 또는 바이러스 벡터는 바람직하게는 통상적인 방법에 의해 오염에 대해 평가되고 그 다음 환자에게 투여에 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다. 그와 같은 제형은 약제학적으로 및/또는 생리적으로 허용가능한 비히클 또는 담체, 예컨대 완충 식염수 또는 다른 완충액, 예를 들어, 적절한 생리적 수준에서 pH를 유지하기 위한 HEPES, 및, 선택적으로, 다른 의약품, 약제학적, 안정화제, 완충액, 캐리어, 아췌반트, 희석제, 계면활성제, 또는 부형제 등의 사용을 포함한다. 주사를 위해, 담체는 전형적으로 액체일 것이다. 예시적인 생리적으로 허용가능한 캐리어는 멸균, 무발열원 물 및 멸균, 무발열원, 포스페이트 완충 식염수를 포함한다. 다양한 이러한 알려진 담체는 본 명세서에 참고로 편입되는 미국 특허 공보 번호 7,629,322에 제공되어 있다. 일 구현예에서, 담체는 등장성 염화나트륨 용액이다. 또 다른 구현예에서, 담체는 평형 염류액이다. 일 구현예에서, 담체는 트윈을 포함한다. 바이러스가 장기간 저장되어야 하는 경우, 글리세롤 또는 Tween20의 존재하에 냉동될 수 있다.

[0083] 하나의 예시적인 특정 구현예에서, 담체 또는 부형제의 조성물은 180 mM NaCl, 10 mM NaPi, 0.0001% - 0.01% 플루론산 F68 (PF68)로 pH7.3을 함유한다. 완충액의 염수 성분의 정확한 조성은 160 mM 내지 180 mM NaCl의 범위이다. 선택적으로, 상이한 pH 완충액 (잠재적으로 HEPES, 중탄산나트륨, TRIS)이 구체적으로 기재된 완충액 대신에 사용된다. 여전히 대안적으로, 0.9% NaCl을 함유하는 완충액이 유용하다.

[0084] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "투약량"은 치료 과정에서 대상체에게 전달되는 총 투약량, 또는 단일 단위 (또는 다중 단위 또는 분할 투약량) 투여로 전달되는 양을 지칭할 수 있다. 약제학적 바이러스 조성물은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 TPP1을 인코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 수반하는 복제-결합있는 바이러스의 양을 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 약 1.0×10^9 GC 내지 약 1.0×10^{16} GC의 범위인 양으로 함유하도록 투여량 단위로 제형화될 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 또는 9×10^9 GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 또는 9×10^{10} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 또는 9×10^{11} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} ,

7×10^{12} , 8×10^{12} , 또는 9×10^{12} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 또는 9×10^{13} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 또는 9×10^{14} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 또는 9×10^{15} GC를 함유하도록 제형화된다. 일 구현예에서, 인간 적용의 경우 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC의 범위일 수 있다. 모든 투약량은 예를 들어, 본 명세서에 참고로 편입되는, M. Lock 등, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 1 15-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131에 기재된 바와 같은 oqPCR 또는 디지털 액적 PCR (ddPCR)에 의해 측정된 것과 같은 것을 포함하여, 임의의 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0085] 일 구현예에서, 바텐 환자에게 투여하기에 적합한 수성 현탁액이 제공된다. 현탁액은 수성 현탁 액체 및 바텐병에 대한 치료제로서 유용한 본 명세서에 기재된 재조합 아데노-연관된 바이러스 (rAAV)의 뇌 그램 당 약 7.5×10^9 GC 또는 바이러스 입자 내지 약 1×10^{12} GC 또는 바이러스 입자를 포함한다.

[0086] 본 발명의 약제학적 조성물의 다중 "부스터" 투약량을 투여하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 예를 들어, CNS 내의 이식유전자의 지속기간에 따라, 6개월 간격으로, 또는 제1 투여 후 매년 부스터 투약량을 전달할 수 있다. rAAV 벡터의 투여에 의해 AAV-중화하는 항체가 생성되지 않았다는 사실은 추가의 부스터 투여를 허용해야 한다.

[0087] 이러한 부스터 투약량 및 그 필요성은, 예를 들어, TPP1 활성 및 하기 실시예에 기재된 신경인지 테스트를 사용하여 주치의에 의해 모니터링될 수 있다. 경시적으로 치료된 대상체의 상태를 결정하기 위해 다른 유사한 테스트가 사용될 수 있다. 적절한 테스트의 선택은 주치의에 의해 될 수 있다. 여전히 대안적으로, 본 발명의 방법은 단일 또는 다중 감염에서 더 많은 용적의 바이러스-함유 용액을 주사를 포함하여 정상 대상체에서 발견되는 것에 밀접한 TPP1 활성 수준을 허용할 수 있다.

[0088] 이들 상기 용량은 환자의 크기, 사용된 바이러스 역가, 투여 경로, 및 본 방법의 원하는 효과에 따라, 범위 내의 모든 수를 포함하여, 약 100 마이크로리터 내지 약 50 mL의 범위인 다양한 용적의 담체, 부형제 또는 완충액 제형에 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 담체, 부형제 또는 완충액의 용적은 적어도 약 500 μ L이다. 일 구현예에서, 용적은 약 750 μ L이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 1 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 2 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 3 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 4 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 5 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 6 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 7 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 8 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 9 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 10 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 11 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 12 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 13 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 14 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 15 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 16 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 17 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 18 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 19 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 20 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 21 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 22 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 23 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 24 mL이다. 또 다른 구현예에서, 용적은 약 25 mL 또는 그 초과이다. 일 구현예에서, 최대 주입된 용적은 총 뇌척수액 용적의 약 10%이다.

[0089] 일 구현예에서, 바이러스 작제물은 작은 동물 대상체, 예컨대 마우스에 대해 약 100 마이크로리터 mL 내지 약 1 mL의 용적에 적어도 1×10^9 내지 약 적어도 1×10^{13} GC의 용량으로 전달될 수 있다. 더 큰 수의과 대상체의 경우, 더 큰 인간 투약량 및 상기 언급된 용적이 유용하다. 예를 들어, 다양한 수의과 동물에게 물질의 투여를 위해 양호한 실시의 논의에 대해서는 Diehl 등, J. Applied Toxicology, 21: 15-23 (2001)을 참고한다. 이 문서는 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0090] 독성과 같은 바람직하지 않은 효과의 위험을 감소시키기 위해 바이러스 또는 다른 전달 비히클의 최저 유효 농도가 이용되는 것이 바람직하다. 이들 범위에서의 또 다른 투약량은 투여되는 대상체, 바람직하게는 인간의 신체적 상태, 대상체의 연령 및 장애가 발달한 정도를 고려하여 주치의에 의해 선택될 수 있다.

[0091] 본 명세서에 기재된 또 다른 양태는 포유동물 대상체에서 바텐병의 진행을 치료, 지연 또는 중지시키는 방법이

다. 일 구현예에서, 바람직하게는 생리적으로 양립가능한 담체, 희석제, 부형제 및/또는 아쥘반트에 현탁된 CLN2 천연, 변형된 또는 코돈 최적화된 서열을 담지하는 rAAV는 치료 유효량으로 인간 대상체를 포함하는 원하는 대상체에게 투여될 수 있다. 이 방법은 임의의 핵산 서열, 발현 카세트, rAAV 게놈, 플라스미드, 벡터 또는 rAAV 벡터 또는 이들을 함유하는 조성물을 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 본 조성물은 척수강내로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 ICV를 통해 전달된다. 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 바텐병의 치료에 적합한 투여 경로의 조합을 사용하여 전달되며, 또한 정맥내 투여 또는 다른 통상적인 투여 경로를 포함할 수 있다.

[0092] 이들 방법에서 사용하기 위해, 각각의 투약량의 용적 및 바이러스 역가는 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 개별적으로 결정된다. 투약량, 투여 및 요법은 본 명세서의 교시가 주어지면 주치의에 의해 결정될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 방법은 조성물을 2회 이상의 투약량 (예를 들어, 분할 투약량)으로 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 선택된 발현 카세트 (예를 들어, CLN2 함유 카세트)를 포함하는 rAAV의 제2 투여는 나중 시점에서 수행된다. 그와 같은 시점은 제1 투여 후 수주, 수개월 또는 수년일 수 있다. 그와 같은 제2 투여는 일 구현예에서 제1 투여로부터 rAAV와 상이한 캡시드를 갖는 rAAV로 수행된다. 또 다른 구현예에서, 제1 및 제2 투여로부터의 rAAV는 동일한 캡시드를 갖는다.

[0093] 또 다른 구현예에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 단일 조성물 또는 다중 조성물로 전달될 수 있다. 선택적으로, 2개 또는 그 초과 상이한 AAV가 전달될 수 있거나, 또는 다중 바이러스가 전달될 수 있다 (예를 들어, WO 2011/126808 및 WO 2013/049493 참고). 또 다른 구현예에서, 다중 바이러스는 상이한 복제-결합있는 바이러스 (예를 들어, AAV 및 아데노바이러스)를 함유할 수 있다.

[0094] 본 발명에 따르면, hTPP1의 "치료 유효량"이 원하는 결과, 즉, 바텐병 또는 이들의 하나 이상의 증상의 치료를 달성하기 위해 본 명세서에서 기재된 바와 같이 전달된다. 신체적 포괄적인 시스템, 발작, 행동, 및 능력 평가인 통일된 바텐병 평가 척도 (UBDRS)가 제안되었다. rarediseases.info.nih.gov/files/mink.pdf에서 접속가능한 Mink, J., The Unified Batten Disease Rating Scale 참고. 일 구현예에서, 치료의 목표는 질환의 진행을 제한하는 것이다. 이것은 CLN2 질환 등급 질환 척도 또는 UBDRS를 사용하여 증상의 정량적 및 정성적 평가에 의해 평가될 수 있다.

[0095] 또 다른 구현예에서, 상기 방법은 치료의 효능을 결정하기 위해 추가의 시험, 예를 들어 감정 및 신경인지 시험을 수행하는 것을 포함한다. 그와 같은 테스트는 위에서 논의된 UBDRS의 일부로 수행되는 것을 포함하며, 비제한적으로, 음성 명료성, 혀 돌출부, 시력, 톤 (팔, 다리, 목), 강도 (팔, 다리), 손 태핑, 발 뒤꿈치 밟기, 자발적인 운동 (운동불능), 정형화된 표현, 긴장이상, 간대성근경련, 떨림, 무도병, 운동측정장애, 보행, 체위성 안정성, 발작, 행동 및 기분, 및 전체적인 건강의 평가를 포함한다.

[0096] 본 명세서에서 기재된 방법의 일 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물의 1회용 전달, 예를 들어, 최적화된 CLN2 카세트의 AAV 전달은 대상체에서 바텐병을 치료하는데 유용하다. 본 명세서에서 기재된 방법의 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물의 1회용 전달, 예를 들어, 최적화된 CLN2 카세트의 AAV 전달은 CLN2 결함을 갖는 대상체에서 바텐병을 예방하는데 유용하다.

[0097] 따라서, 일 구현예에서, 본 조성물은 질환 개시 전에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 신경적 손상의 개시 이전에 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 신경적 손상의 개시 후에 투여된다. 일 구현예에서, 신생아 치료는 전달의 8시간, 처음 12시간, 처음 24시간, 또는 처음 48시간 이내에 본 명세서에서 기재된 바와 같이 TPP1 코딩 서열, 발현 카세트 또는 벡터가 투여되는 것으로 정의된다. 또 다른 구현예에서, 특히 영장류 (인간 또는 비-인간)의 경우, 신생아 전달은 약 12시간 내지 약 1주, 2주, 3주, 또는 약 1개월의 기간 이내, 또는 약 24시간 내지 약 48시간 후이다. 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 증상의 발병 후 전달된다. 일 구현예에서, 환자의 치료 (예를 들어, 제1 주사)는 생후 첫 해에 개시된다. 또 다른 구현예에서, 치료는 처음 1년 후, 또는 처음 2 내지 3세 후에, 5세 이후, 11 세 이후 또는 더 나이가 든 후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 4세에서 약 12세까지 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 4세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 5세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 6세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 7세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 8세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 9세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 10세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 11세 또는 그 이후에 개시된다. 일 구현예에서, 치료는 약 12세 또는 그 이후에 개시된다. 그러나, 치료는 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 또는 약 40세 또는 그 이후에 개시될 수 있다. 일 구현예에서, 자궁에서의 치료는 태아에 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물을 투

여하는 것으로 정의된다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 편입된, David 등, Recombinant adeno-associated virus-mediated in utero gene transfer gives therapeutic transgene expression in the sheep, Hum Gene Ther. 2011 Apr;22(4):419-26. doi: 10.1089/hum.2010.007. Epub 201 1 Feb 2 참고.

- [0098] 또 다른 구현예에서, 본 조성물은 나중에 재투여된다. 선택적으로, 1 초과의 재투여가 허용된다. 그와 같은 재투여는 동일한 유형의 벡터, 상이한 바이러스 벡터로, 또는 본 명세서에서 기재된 바와 같은 비-바이러스 전달을 통해 될 수 있다.
- [0099] 본 명세서에 기재된 치료의 목표는 바텐병의 진행을 제한하거나 중단시키는 것을 포함한다. 치료의 바람직한 결과는, 비제한적으로, UBDRS의 임의의 평가 점수의 증가, TPP1 활성 또는 발현 수준에서의 증가, 신경인지 테스트에 의해 결정된 운동 기능에서의 증가 (또는 그의 손상의 진행에서의 감소) 및 MRI에 의한 피질 용적에서의 증가 (또는 그의 손상의 진행에서의 감소)를 포함한다. 원하는 결과는 근육 약화를 감소시키는 것, 근육 강도 및 톤을 증가시키는 것, 또는 호흡기 건강을 유지 또는 증가시키는 것, 또는 떨림 또는 경련을 감소시키는 것을 포함한다. 다른 원하는 중점은 의사에 의해 결정될 수 있다.
- [0100] 또 다른 구현예에서, 임의의 상기에 기재된 방법은 또 다른, 또는 이차, 요법과 조합하여 수행된다. 이차 요법은 이들 돌연변이 또는 결함 또는 이와 연관된 임의의 효과를 예방, 정지 또는 개선시키는 것을 돕는 임의의 현재 공지된, 또는 아직 알려지지 않은 요법일 수 있다. 이차 요법은 상기 기재된 조성물의 투여 전, 이와 동반하여 또는 그 후에 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 이차 요법은 신경친화성 인자, 산화방지제, 항-세포자멸사의 투여와 같은 망막 세포의 건강을 유지하기 위한 비-특이적 접근법을 포함한다. 비-특이적 접근법은 단백질, 재조합 DNA, 재조합 바이러스 벡터, 줄기 세포, 태아 조직, 또는 유전자 변형된 세포의 주사를 통해 달성된다. 후자는 캡슐화된 유전자 변형된 세포를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 이차 요법은 뇌심실내 뇌실 리포나제 알파 (BMN 190)이다. 본 명세서에 참고로 편입된, Schulz 등, Intracerebroventricular cerliponase alfa (BMN 190) in children with CLN 2 disease: results from a phase 1/2 open label, dose-escalation study, J Inherit Metab Disease, 39: S51 참고. 권고된 투약량은 격주로 투여된 30-300 mg ICV 주입이다.
- [0101] 일 구현예에서, 재조합 rAAV를 생성하는 방법은 상기 기재된 바와 같은 AAV 발현 카세트를 함유하는 플라스미드를 수득하는 단계, AAV 바이러스 게놈의 감염성 AAV 외피 또는 캡시드로의 패키징을 허용하기에 충분한 바이러스 서열의 존재하에 플라스미드를 담지하는 포장 세포를 배양하는 단계를 포함한다. rAAV 벡터 생성의 특이적 방법은 상기에 기재되어 있으며, 상기 기재된 발현 카세트 및 게놈과 하기 실시예에서 코돈 최적화된 CLN2를 전달할 수 있는 rAAV 벡터를 생성하는데 이용될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 특정 구현예에서, 대상체는 본 발명의 성분, 조성물 및 방법이 이를 치료하도록 설계된 바텐병을 갖고 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "대상체"는 인간, 수의과 또는 농장 동물, 가축 또는 애완동물 및 임상 연구에 정상적으로 사용되는 동물을 포함하는 포유동물의 동물을 의미한다. 일 구현예에서, 이들 방법 및 조성물의 대상체는 인간이다. 또 다른 적합한 대상체는, 비제한적으로, 쥐과, 랫트, 개과, 고양이, 돼지, 소과, 양, 비-인간 영장류 및 기타를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 "환자"와 교환가능하게 사용된다.
- [0103] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 바텐병의 하나 이상의 증상의 개선의 목적을 위해 본 명세서에 기재된 하나 이상의 화합물 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포괄하는 것으로 정의된다. "치료"는 따라서 바텐병의 발병 또는 진행을 감소시키는 것, 질환을 예방하는 것, 질환의 중증도 증상을 감소시키는 것, 또는 신경적 손상의 진행을 포함하여 그것의 진행을 지연시키는 것, 질환 증상을 제거하는 것, 질환의 발병을 지연시키는 것 또는 주어진 대상체에서 질환의 진행 또는 치료의 효능을 모니터링하는 것을 포함할 수 있다.
- [0104] 일 양태에서, 기능적 TPP1 단백질을 인코딩하는 코딩 서열이 제공된다. "기능적 hTPP1"은 질환과 연관되지 않은 천연 TPP1 단백질, 또는 이들의 천연 변이체 또는 다형체의 생물학적 활성 수준의 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100%이거나, 또는 그 초과를 제공하는 TPP1 단백질을 인코딩하는 유전자를 의미한다.
- [0105] 시험관내 TPP1 발현 및 활성 수준을 측정하기 위한 다양한 검정이 존재한다. 예를 들어, 하기 실시예 2를 참고한다. 본 명세서에서 기재된 방법은 또한 바텐병 또는 그것의 증상의 치료를 위한 임의의 다른 요법과 조합될 수 있다. CLN2 질병의 관리는 복잡하다. 환자들은 높은 증상 부담 및 기능적 저하의 빠른 속도 때문에 광범위한 여러 전문분야 의료 보호가 필요하며 가족은 광범위한 심리사회적 지원이 필요하지만, 현재 이 상태에 대한 관

리 지침은 여전히 없다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 편입된, Williams 등, Management strategies for CLN2 disease, *Pediatric Neurology* 69 (2017) 102e1 12 참고. 그러나, 특정 구현예에서, 관리 기준은 뇌심실 내 뇌실 리나제 알파 (BMN 190)를 포함할 수 있다. 본 명세서에 참고로 편입된, Schulz 등, Intracerebroventricular cerliponase alfa (BMN 190) in children with CLN 2 disease: results from a phase 1/2 open label, dose-escalation study, *J Inherit Metab Disease*, 39:S51 참고. 권고된 투약량은 격주로 투여된 30-300 mg ICV 주입이다.

[0106] 특정 구현예에서, AAV9.CLN2 벡터가 생산된다. 수많은 적합한 정제 방법이 선택될 수 있다. 적합한 정제 방법의 예는, 예를 들어, 2016년 12월 9일 출원된 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/065970 및 그것의 우선권 문서, 2016년 4월 13일 출원된 미국 특허 출원 번호 62/322,071 및 2015년 12월 11일 출원되고 "AAV9에 대한 확장가능한 정제 방법"으로 명칭된 62/226,357에 기재되어 있고, 이것은 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0107] AAV 바이러스 벡터의 경우에 있어, 게놈 복제 ("GC")의 정량화가 제형에 함유된 용량의 측정치로서 사용될 수 있다. 당해 분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 본 발명의 복제-결합있는 바이러스 조성물의 게놈 복제 (GC) 수를 결정할 수 있다. AAV GC 수 적정을 수행하는 하나의 방법은 아래와 같다: 정제된 AAV 벡터 샘플은 먼저 생산 과정으로부터 오염된 숙주 DNA를 제거하기 위해 DNase로 처리된다. DNase 저항성 입자는 그런 다음 열처리를 거쳐 캡시드로부터 게놈을 방출시킨다. 방출된 게놈은 그런 다음 바이러스 게놈의 특정 영역 (예를 들어, 폴리 A 신호)을 표적화하는 프라이머/프로브 세트를 사용하여 실시간 PCR에 의해 정량화한다. 게놈 복제를 결정하기 위한 또 다른 적합한 방법은 정량적-PCR (qPCR), 특히 최적화된 qPCR 또는 디지털 액적 PCR이다 [Lock Martin, 등, *Human Gene Therapy Methods*, April 2014, 25(2): 115- 125. doi: 10.1089/hgtb.2013.131, 2013년 12월 13일 편집 전에 온라인으로 공개됨]. 대안적으로, ViroCyt3100은 입자 정량화 또는 유세포측정에 사용될 수 있다. 또 다른 방법에서, 최적화된 TPP1 코딩 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 담지하는 재조합 아데노-연관된 바이러스의 효과적인 용량은, 전체적으로 참고로 편입된, S.K. McLaughlin 등, 1988 *J. Virol.*, 62: 1963에서 기재된 바와 같이 측정된다.

[0108] 복제-결합있는 바이러스 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 (체중에 있어서 70kg의 평균 대상체를 치료하기 위해) 약 1.0×10^9 GC 내지 약 9×10^{15} GC의 범위이고, 바람직하게는 인간 환자에 대해 1.0×10^{12} GC 내지 1.0×10^{14} GC인 복제-결합있는 바이러스의 양을 함유하도록 투약량 단위로 제형화될 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 또는 9×10^9 GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 또는 9×10^{10} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 또는 9×10^{11} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 또는 9×10^{12} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 또는 9×10^{13} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 또는 9×10^{14} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 적어도 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 또는 9×10^{15} GC를 함유하도록 제형화된다. 일 구현예에서, 인간 적용의 경우 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하는 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{15} GC의 범위일 수 있다.

[0109] 특정 구현예에서, 용량은 약 1×10^9 GC/g 뇌 질량 내지 약 1×10^{12} GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다. 특정 구현예에서, 용량은 약 3×10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 약 3×10^{11} GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다. 특정 구현예에서, 용량은 약 5×10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 약 1.85×10^{11} GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다.

- [0110] 일 구현예에서, 바이러스 작제물은 적어도 약 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{15} , 또는 약 1×10^{11} 내지 5×10^{13} GC의 용량으로 전달될 수 있다. 이들 용량 및 농도의 전달에 적합한 용적은 당해 분야의 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 1 μ L 내지 150 mL의 용적이 선택될 수 있고, 더 높은 용적이 성인에 대해 선택되어 진다. 전형적으로, 신생 영아의 경우 적합한 용적은 약 0.5 mL 내지 약 10 mL이고, 나이든 영아의 경우, 약 0.5 mL 내지 약 15 mL가 선택될 수 있다. 유아의 경우, 약 0.5 mL 내지 약 20 mL의 용적이 선택될 수 있다. 소아의 경우, 최대 약 30 mL의 용적이 선택될 수 있다. 예비-심대 및 심대의 경우, 최대 약 50 mL 용적이 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 환자는 선택된 약 5 mL 내지 약 15 mL, 또는 약 7.5 mL 내지 약 10 mL의 용적으로 척수강내 투여를 받을 수 있다. 다른 적합한 용적 및 투약량이 결정될 수 있다. 투약량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추기 위해 조정될 것이고 이러한 투약량은 제조법 백터가 이용된 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다.
- [0111] 상기-기재된 재조합 백터는 공개된 방법에 따라 숙주세포로 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 환자에게 투여하기 위해, rAAV는 염수, 계면 활성제, 및 생리적으로 양립가능한 염 또는 염의 혼합물을 함유하는 수용액에 적합하게 현탁된다. 적합하게는, 제형은 생리적으로 허용가능한 pH, 예를 들어 pH 6 내지 9, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8의 범위내로 조정된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32 이므로, 척수강내 전달을 위해, 이 범위 내의 pH가 바람직할 수 있다; 반면에 정맥내 전달의 경우, 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이들 하위범위 내의 다른 pH가 다른 전달 경로에 대해 선택될 수 있다.
- [0112] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합이 비독성인 비-이온성 계면활성제들 중에서도 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 일차 하이드록실 기에서 종료하는 이중작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 예컨대 중성 pH를 가지고 8400의 평균 분자량을 갖는 폴록사머 188로도 알려져 있는, Pluronic® F68 (BASF)이 선택된다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리 옥시 에틸렌 (폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개 친수성 사슬에 의해 측점된 폴리옥시프로필렌 (폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 트리블록 공중합체, SUTOL HS 15 (매크로골-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL (폴리 옥시 카프릴릭 글리세라이드), 폴리 옥시 10 올레일 에테르, TWEEN (폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 일반적으로 문자 "P" (폴록사머의 경우)에 이어서 3자리 숫자로 통상적으로 명명된다: 처음 2 자리 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 근사치 분자량을 제공하고, 마지막 자리 x 10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 구현예에서, 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다.
- [0113] 일 예에서, 제형은, 예를 들어, 물 내 염화나트륨, 중탄산나트륨, 텍스트로스, 황산마그네슘 (예를 들어, 황산마그네슘 · 7H₂O), 칼륨 염화물, 염화칼슘 (예를 들어, 염화칼슘 · 2H₂O), 이염기성 인산나트륨, 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함하는 완충 식염수 용액을 함유할 수 있다. 적합하게, 척수강내 전달의 경우, 삼투물농도는 뇌척수액과 양립가능한 범위 내이다 (예를 들어, 약 275 내지 약 290); 예를 들어, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview 참고. 선택적으로, 척수강내 전달의 경우, 상업적으로 입수 가능한 희석제가 현탁화제로, 또는 또 다른 현탁화제 및 다른 선택적인 부형제와 조합으로 사용될 수 있다. 예를 들어, Elliotts B® 용액 (Lukare Medical) 참고. 다른 구현예에서, 제형은 하나 이상의 투과 증강제를 함유할 수 있다. 적합한 투과 증강제의 예는, 예를 들어, 만니톨, 나트륨 글리코콜레이트, 나트륨 타우로콜레이트, 나트륨 데옥시콜레이트, 나트륨 살리실레이트, 나트륨 카프릴레이트, 나트륨 카프레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.
- [0114] 또 다른 구현예에서, 조성물은 담체, 희석제, 부형제 및/또는 아췌반트를 포함한다. 적합한 캐리어는 전이 바이러스가 지향되는 조직의 관점에서 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 다양한 완충 용액 (예를 들어, 포스페이트 완충 식염수)으로 제형화될 수 있는 염수를 포함한다. 다른 예시적인 캐리어는 멸균 염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 한천, 펙틴, 땅콩 오일, 참깨 오일, 및 물을 포함한다. 완충액/담체는 rAAV가 주입 튜브에 달라 붙는 것을 방지하지만 생체내에서 rAAV 결합 활성을 방해하지 않는 성분을 포함해야 한다.
- [0115] 선택적으로, 본 발명의 조성물은, rAAV 및 담체(들)에 부가하여, 다른 종래의 약제학적 성분, 예컨대 보존제, 또는 화학적 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀, 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

- [0116] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 상기에 정의된 것을 포함할 수 있다. 적합하게, 본 명세서에 기재된 조성물은 약제학적으로 적합한 담체에 현탁된 및/또는 주사, 삼투 펌프, 척수강 내 카테터를 통한 대상체에게 전달을 위해, 또는 또 다른 디바이스 또는 경로에 의한 전달을 위해 설계된 적합한 부형제와 혼합된 유효량의 하나 이상의 AAV를 포함한다. 일 예에서, 본 조성물은 척수강내 전달을 위해 제형화된다. 일 구현예에서, 척수강내 전달은 척추관, 예를 들어, 지주막하 공간 안으로의 주사를 포괄한다. 일 구현예에서, 전달 경로는 뇌실내 주사 (ICV)이다. 또 다른 구현예에서, 전달 경로는 척수강내-요추 (IT-L) 전달이다.
- [0117] 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터는 hTPP1을 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 인간 환자)에게 전달하고, 기능적 TPP1을 대상체에 공급하고 및/또는 바텐병을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용될 수 있다. 치료의 과정은 선택적으로 동일한 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV9 벡터) 또는 다른 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV9 및 AAVrh10)의 반복 투여를 포함할 수 있다. 또 다른 조합은 본 명세서에 기재된 바이러스 벡터 및 비-바이러스 전달 시스템을 사용하여 선택될 수 있다.
- [0118] 본 명세서에 기재된 hTPP1 cDNA 서열은 당해 분야에서 잘 알려진 기술을 사용하여 시험관내 및 합성으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 긴 DNA 서열 방법의 PCR-계 정확한 합성 (PAS)은 Xiong 등, PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences, *Nature Protocols* 1, 791 - 797 (2006)에 의해 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 이중 비대칭 PCR을 배합시키는 방법 및 중첩 연장 PCR 방법은 Young and Dong, Two-step total gene synthesis method, *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(7): e59에 기재되어 있다. 또한 하기를 참조한다: Gordeeva 등, *J Microbiol Methods*. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the *Citrobacter freundii* phytase gene codon modification. 2010 May;81(2): 147-52. Epub 2010 Mar 10; 또한, 올리고뉴클레오타이드 합성 및 유전자 합성에 대한 하기 특허를 참조한다: Gene Seq. 2012 Apr;6(1): 10-21; US 8008005; 및 US 7985565. 각각의 이들 문서는 본 명세서에 참고로 편입된다. 또한, PCR을 통해 DNA를 생성하기 위한 키트 및 프로토콜은 상업적으로 이용가능하다. 이들은, 비제한적으로, Taq 중합효소; OneTaq® (New England Biolabs); Q5® High-Fidelity DNA 중합효소 (New England Biolabs); 및 GoTaq® G2 중합효소 (Promega)를 포함한 중합효소의 사용을 포함한다. DNA는 또한 본 명세서에 기재된 hOTC 서열을 함유하는 플라스미드로 형질감염된 세포로부터 생성될 수 있다.
- [0119] 키트 및 프로토콜은 알려져 있고 상업적으로 입수가능하며, 비제한적으로, QIAGEN 플라스미드 키트; Chargeswitch® 프로 필터 플라스미드 키트 (Invitrogen); 및 GenElute™ 플라스미드 키트 (Sigma Aldrich)를 포함한다. 본 명세서에 유용한 다른 기술은 열순환의 필요성을 제거하는 서열-특이적 등온 증폭 방법을 포함한다. 열 대신에, 이들 방법은 전형적으로 이중나선 DNA를 분리하기 위해 Bst DNA Polymerase, Large Fragment (New England Biolabs)와 같은 가닥-치환 DNA 중합효소를 사용한다. DNA는 또한 RNA-의존적 DNA 중합효소인 역전사효소 (RT)의 사용을 통한 증폭을 통해 RNA 분자로부터 생성될 수 있다. RT는 최초 RNA 템플레이트에 상보적이고 cDNA로 지칭되는 DNA 가닥을 중합시킨다. 이 cDNA는 그런 다음 상기 설명된 바와 같은 PCR 또는 등온 방법을 통해 추가로 증폭될 수 있다. 구입 DNA는 또한, 비제한적으로, GenScript; GENEWIZ®; GeneArt® (Life Technologies); 및 Integrated DNA Technologies를 포함한 회사로부터 상업적으로 생성될 수 있다.
- [0120] 용어 "발현"은 본 명세서에 그것의 가장 넓은 의미로 사용되고 RNA의 생산 또는 RNA와 단백질의 생산을 포함한다. RNA에 관하여, 용어 "발현" 또는 "번역"은 특히 펩타이드 또는 단백질의 생성에 관한 것이다. 발현은 일시적이거나 안정적인 수 있다.
- [0121] 본 발명의 맥락에서 용어 "번역"은 리보솜에서의 공정에 관한 것으로, 여기서 mRNA 가닥은 아미노산 서열의 조립을 제어하여 단백질 또는 펩타이드를 생성한다.
- [0122] 용어 "a" 또는 "an"은 하나 이상을 지칭한다는 것에 유의해야 한다. 이와 같이, 용어 "a" (또는 "an"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0123] 단어 "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 배타적이지 않은 포괄적인 것으로 해석되어야 한다. 단어 "구성된다", "구성하는" 및 그것의 변형은 포괄적이지 않은 독점적인 것으로 해석되어야 한다. 본 명세서의 다양한 구현예는 "포함하는" 언어를 사용하여 제시되지만, 다른 환경 하에서, 관련된 구현예는 또한 "구성되는" 또는 "본질적으로 구성되는" 언어를 사용하여 해석되고 설명되도록 의도된다.
- [0124] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "질환", "장애" 및 "병태"는 대상체에서 비정상 상태를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다.

- [0125] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약" 또는 "~"는 달리 구체화되지 않는 한 주어진 참조로부터 10%의 가변성을 의미한다.
- [0126] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "조절" 또는 이의 변형은 생물학적 경로의 하나 이상의 성분을 억제하는 조성물의 능력을 지칭한다.
- [0127] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 기술 및 과학 용어들은 당해 분야의 숙련가에 의해 그리고 공개된 문헌을 참고로 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고, 이는 당해 분야의 숙련가에게 본원에서 사용된 많은 용어들에 대한 일반적인 지침을 제공한다.
- [0128] 실시예
- [0129] 하기 실시예는 단지 설명적이고 본 발명을 한정하고자 하는 것은 아니다.
- [0130] 실시예 1: AAV.hTPP1co 벡터
- [0131] 인간 (h) TPP1-인코딩 최적화된 cDNA가 최적의 코돈 용법을 위해 구입-설계되고 합성되었다. 도 1F에서 나타낸 바와 같이 서열번호: 3으로 재생산된 hTPP1co cDNA는 그런 다음 사이토메갈로바이러스 (CMV) 전초기 향상제 (C4)와 치킨 베타 액틴 프로모터 사이의 하이브리드인 CB7 프로모터에 의해 유도된 이식유전자 발현 카세트에 배치되었고, 반면에 이 프로모터로부터의 전사는 치킨 베타 액틴 인트론 (CI)의 존재에 의해 향상된다 (도 1A 및 1B). 발현 카세트에 대한 폴리A 신호는 토끼 베타-글로빈 (RBG) 폴리A이다.
- [0132] AAV.hTPP1co 벡터의 6841 bp 생산 플라스미드 (AAV.CB7.CI.hTPP1co.RBG)는 AAV2 유래된 ITR에 의해 축적될 뿐만 아니라 선택적 마커로서 암피실린에 대해 저항성인 본 명세서에 기재된 hTPP1co 발현 카세트에 의해 생성되었다 (도 1B). 카나마이신에 대해 저항성을 갖는 유사한 AAV.hTPP1co 생산 플라스미드가 또한 생성되었다. 양 플라스미드로부터 유래된 벡터는 본 명세서에 기재된 hTPP1co 발현 카세트를 축적하는 AAV2 유래된 ITR을 갖는 단일-가닥 DNA 게놈이었다.
- [0133] AAV.hTPP1co 벡터는 삼중 형질감염에 의해 제조되었고 포스페이트-완충 식염수 (PBS) 함유 및 0.001% 플루론산 F68 (PF68)로 구성되는 부형제에서 제형화되었다. 예를 들어 Mizukami, Hiroaki, 등, A Protocol for AAV vector production and purification, Diss. Di-vision of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, 1998 참고. 생산된 벡터의 게놈 역가는 액적 디지털 PCR (ddPCR)을 통해 결정되었다. 예를 들어, M. Lock 등, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14 참고.
- [0134] 실시예 2: AAV.hTPP1co 벡터의 시험관내 발현
- [0135] AAV.hTPP1co는 시험관내 기능적 TPP1의 발현에 대해 시험되었다. HEK 293 세포는 6-웰 플레이트에 분주되었다. 약 90% 밀집도에 도달한 경우, 세포는 5 μ g의 AAV.hTPP1co 벡터 또는 무 DNA로 형질감염되었다. 72시간 후에, 세포 배양물의 상청액을 수확하였고 TPP1 활성 / 효소 검정을 위해 가공하였다.
- [0136] TPP1 검정을 위해, 플루오로제닉 기질인, AAF-AMC (Bachem, 카탈로그 # I- 1415, DMSO에 용해된 10 mM)을 50 mM 아세트산나트륨 및 100mM 염화나트륨을 함유하는 검정 완충액에서 pH 5.0에서) 500 μ M으로 희석하였다. 50 μ L의 시험된 샘플 (상청액)을 먼저 블랙 웰 플레이트 안으로 반복하여 장입하였다. 500 μ M 기질 중 50 μ L를 각 웰에 첨가하여 기능적 TPP1에 의해 촉매접촉된 생성물로 기질을 전환하고 형광 생성물인, AMC를 방출하는 반응을 개시하였다. 샘플로부터의 형광 신호의 강도는 동력학 방식으로 형광 마이크로플레이트 판독기를 통해 10분 동안 모니터링하였다 (방출 파장은 460 nm로 설정된 반면 여기 파장은 380 nm였다). 7-아미노-4-메틸쿠마린 (AMC, Thermo Fisher #A 191)을 형광 참조 표준으로 이용하였다. 방출된 형광 생성물의 농도는 검정 완충액에 희석된 AMC의 표준 곡선을 기초하여 계산하였고 그 다음 도 2에 플롯팅하였다.
- [0137] 10-분 관찰 기간 동안, AAV.hTPP1co로 형질감염된 세포 배양물로부터의 상청액은 형광 신호 (CB7.CLN2, 도 2의 상부 라인)의 꾸준하고 급격한 증가를 실증한 반면 비-형질감염된 세포에서 만으로부터의 상청액은 약간의 증가를 나타냈다 (모의, 도 2의 하부 라인). 이 결과는 AAV.hTPP1co 벡터가 시험관내 인간 기능적 TPP1 단백질을 발현할 수 있음을 나타내었다.
- [0138] 실시예 3: AAV.hTPP1co 벡터의 생체내 발현
- [0139] 본 명세서에 기재된 AAV.hTPP1co 벡터의 생체내 발현을 평가하기 위해, 10개의 C57BL/6J 야생형 수컷 마우스에

1×10^{11} GC에서 뇌심실내 투여를 통해 본 명세서에 기재된 AAV.hTPP1co를 주입하였다. 마우스를 12-시간 명/12-시간 암 주기로 유지시키고, 음식/물을 임의로 제공하였다. 주사하지 않은 10마리의 야생형 수컷 마우스를 대조군으로 하였다. 모든 마우스를 희생시키고 주사 14일 후에 검사를 수행하였다. TPP1의 발현 및 명백한 독성을 평가하였다.

[0140] 쥐와 뇌에서 TPP1의 발현을 평가하기 위해, 상기 기재된 마우스의 뇌 샘플을 수확하고 MPS® 조직 세포용해 버퍼에서 균질화시켰다. 뇌 용해물의 단백질 농도는 비시코닌산 검정 (BCA 검정)에 의해 결정되었다. 뇌 용해물의 TPP1 효소 활성을 실시예 2에 기재된 바와 같이 측정하고 단위/h/μg 뇌 단백질로 정규화하였다. 기질로 그리고 뇌 용해물 없이 인큐베이션된 검정 완충액을 음성 대조군으로 하였다. 결과를 도 3A에 플롯팅하였다. 주사하지 않은 야생형 마우스의 뇌 용해물 (WT, 도 3A)은 음성 대조군 (블랭크, 도 3A)과 비교하여 TPP1 효소 활성을 실증한 반면, 최고 수준의 TPP1 효소 활성은 AAV.hTPP1co로 처리된 마우스에서 관찰되었다 (WT+le11, 도 3A).

[0141] 상기 기재된 시험된 동물의 뇌척수액 (CSF, 도 3B), 혈청 (도 3C) 및 간 (도 3D)을 사용한 TPP1 효소 활성의 행한 연구를 수행하였다. 수집 도중 혈액으로 오염된 CSF 샘플은 측정에서 배제하였다. 간 샘플에 대한 결과는 BCA 검정에 의해 결정된 간 단백질의 단위/h/μg로 정규화되었고, 반면 CSF 및 혈청 샘플에 대한 결과는 검정에 사용된 시험된 샘플의 액체 용적의 단위/h/μg로 정규화되었다. AAV.hTPP1co를 주입한 마우스의 TPP1 효소 활성에서의 증가가 처리하지 않은 마우스 (WT)에 비교하여 CSF (WT + le11, 도 3B), 혈청 (WT + le11, 도 3C) 및 간 (WT + le11, 도 3D)에서 관측되었다.

[0142] 상기를 고려하여, 본 명세서에 기재된 AAV.hTPP1co의 주사는 생체내 기능적 인간 TPP1의 발현을 초래하였다.

[0143] 시험된 마우스의 조직 및 기관, 예컨대 뇌, 눈, 간, 폐, 신장 및 근육을 또한 수집하였고, 독성 평가, 예컨대 손상 반응 마커 (GFAP 및 등)의 형태 및 면역염색을 위해 가공한다.

[0144] 실시예 4: TPP1 녹아웃 (KO) 마우스/마우스 모델에서 AAV.hTPP1co 벡터

[0145] AAV.hTPP1co 주사의 효능을 평가하기 위해, TPP1 녹아웃 (KO) 마우스를 수득하고, 임의로 제공된 음식/물과 함께 12-시간 명/12-시간 암 주기로 유지하였다. 2-3개월령 암컷 TPP1 KO 마우스 (KO 마우스)를 이용하였다. 뇌심실내 투여를 통해 5마리 마우스에 1×10^{11} GC의 AAV.hTPP1co 벡터를 주입한 반면, 4마리 마우스에는 대조군으로서 포스포에이트-완충 식염수 (PBS)를 주입하였다. 시험된 마우스의 체중을 모니터링하고 기록하였다. 뇌, CSF, 혈청 및 간으로부터의 샘플의 TPP1 효소 활성을 측정하였다. GFAP 발현에 의해 평가된 뇌 조직학, 예컨대 지갈소 오토-형광 및 별아교세포증을 평가하였다. 로타로드, 떨림 평점 및 등지 건축과 같은 기능적 및 행동 테스트가 수행되었다.

[0146] CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델은 과학적 문헌에 광범위하게 기재되어 있지 않지만, Karst 등 (2016)로부터 이용가능한 데이터 및 천연 이력 연구는 Tpp1mlj 마우스 모델이 표적 환자 모집단의 많은 특징적인 특징을 재현하는 CLN2 질환의 생물학적으로-관련된 동물 모델이라는 것을 입증한다. Tpp1mlj 마우스 모델은 가용성 리소솜 효소 TPP1을 인코딩하는 CLN2 유전자의 엑손 8의 스플라이스 공여체 부위 다운스트림에서 단일 뉴클레오타이드 돌연변이를 초래한다. 이 돌연변이의 결과로, Tpp1mlj 마우스는 뇌 조직에서 검출불가능한 수준의 TPP1 효소 활성뿐만 아니라 CLN2 질환을 가진 인간과 유사한 병리생리학, 표현형 및 사망률을 나타낸다. CNS 조직에서 염증 및 신경교 세포 활성화는 이 마우스 모델에서 1-개월령 이전에 시작되는 것으로 보이고 반면, 지갈소의 축적은 2-개월령까지 뉴런에서 검출가능하다. 후속으로, 동물은 뇌, 척수 및 운동 뉴런에서 진행성 뉴런 퇴행을 나타낸다. Tpp1mlj 마우스는 초기에 일정한 떨림, 줄어든 신경행동 기능, 및 체중 감소를 경시적으로 진행하기 전에, 2-개월령부터 시작되는 간헐적 떨림 및 등을 구부린 자세를 나타낸다. 발작과 사망은 3.5-개월령부터 초기에 관찰되며 100% 사망률은 6-개월령까지 관찰된다 (Karst 등, 2016; 미공개된 데이터). 요약하면, Tpp1mlj 마우스 모델은 CLN2 질환의 생물학적으로-관련된 동물 모델이며 Tpp1mlPlob 마우스 (Sleat 등, 2004) 및 TPP1-null dachshund (Awano 등, 2006) 모델을 포함하여 다른 확립된 마우스 및 개과 모델과 매우 유사하다.

[0147] 개과 및 쥐과 모델을 포함하여 CLN2 질환의 몇 개의 보고된 동물 모델이 있다. 과학적 문헌에서 가장 잘-특정된 것은 Dachshunds (Awano 등, 2006)의 모집단에서 처음 보고된 TPP1-null 개과 모델이다. 개과 TPP1의 엑손 4에서 단일 뉴클레오타이드 결실 (인간 CLN2의 개과 오쏘로그) 및 미성숙한 정지 코돈으로 예상된 틀이동 돌연변이의 결과로, 영향받은 개과는 결핍된 TPP1 효소적 활성 (뇌 조직에서 <1% WT 수준), 일반화된 근간대성 발작 (디아제팜에 반응성), 망막 퇴행 및 시력 손실, 진행성 신경적 징후 (구토, 떨림, 학습된 명령에 비반응성, 고유 운동실조증, 협박에서의 비대칭 감소 반응, 소뇌 운동실조증, 운동 기능이상, 과잉행동, 머리의 간대성근 경련, 줄어든 인지 기능), 및 조기 사망률 (~10-12개월령)을 포함하여 CLN2 질환을 가진 인간의 많은 임상적 및

생화학적 징후를 나타냈다. 신경 세포 손실, 백질의 고갈, 진행성 뇌 위축증, 및 특징적인 곡선형상-표현 물질로 구성된 자가형광 저장 과립의 리소좀 축적을 포함한, 인간에서의 CLN2 질환과 일치하는 광범위한 신경병리학이 또한 분명하다. 그러나, 이 동물의 교배 구축 및 극도로 제한된 이용가능성은 AAV9.CB7.hCLN2에 대한 전임상 시험 프로그램에서 TPP1-null 겹과 모델의 사용에 어려움을 제기한다.

[0148] 과학적 문헌에서 CLN2 질환의 가장 통상적으로-보고된 겹과 모델은 Peter Lobel 박사에 의해 개발된 TpltmlPlob 마우스 모델이다 (Sleat 등, 2004). 이 모델에서, CLN2 유전자는 인트론 11에서 네오마이신 카세트를 운반한다. 그 결과, 이들 동물의 뇌에는 검출가능한 TPP1 효소적 활성이 없다. 이 모델에서의 병리생리학 및 신경행동 변화는 진행성 신경적 징후 (손상된 운동 기능, 떨림, 발작), 광범위한 신경병리학 (뇌의 진행성 리소좀 축적 및 염증, 광범위한 축삭 변성) 및 단축된 수명 (~ 6개월)을 포함하여 인간에서의 CLN2 질환을 반영한다. TpltmlPlob 마우스 모델은 수많은 임상 단계 프로그램의 전임상 시험 프로그램에 통합되었다 (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT00151216, NCT01414985, NCT01161576; Passini 등, 2005; Passini 등, 2006; Sondhi 등, 2007; Sondhi 등, 2008). 그러나, TpltmlPlob 마우스 모델은 상업적으로-이용가능하지 않고 따라서 AAV9.CB7.hCLN2에 대한 전임상 시험 프로그램에 포함시킬 수 없었다.

[0149] TpltmlPlob 마우스 모델에 고도로 유사한 CLN2 질환의 Tplmlj 마우스 모델은 Jackson Laboratories를 통해 상업적으로-이용가능하다. 이 마우스 모델은 CLN2 유전자의 엑손 8의 스플라이스 공여체 부위 다운스트림에서 단일 뉴클레오타이드 돌연변이를 초래한다. 이 돌연변이의 결과로, Tplmlj 마우스는 뇌 조직에서 검출불가능한 수준의 TPP1 효소적 활성뿐만 아니라 CLN2 질환을 가진 인간과 유사한 병리생리학, 표현형 및 사망률을 나타낸다 (Karst 등, 2016).

[0150] Tplmlj 마우스 모델을 더욱 특성화하기 위해 천연 이력 연구가 수행되었다. 간단히, 야생형 (n=40) 및 Tplmlj 마우스 (n=60)를 1- (n=20), 3- (n=20), 및 5.5- (n=20)개월령에서 (실행가능하면, 생존한 동물의) 계획된 희생으로 질환 표현형 (체중, 임상 관찰, 생존)의 진행에 대해 모니터링하여 뇌 조직에서 TPP1 효소적 활성 및 조직병리 (리소좀 저장 물질의 축적, 별아교세포증)를 평가하였다. 간단히, 우리-측면 관찰은 2-개월령에서 다수의 Tplmlj 마우스에서 중간 정도 보행 비정상 및/또는 떨림의 개시를 드러낸 반면, 소수의 동물은 다른 임상 증상의 개시 이전에 일반화된 치명적 발작을 경험한 것으로 나타났다. 임상 관찰시 3-개월령에서 Tplmlj 마우스에서 운동 협응의 약간의 손상이 관찰되었다. 대발작 또는 일반화된 긴장-간대 발작은 3.5-개월령 초부터 시작하여 다수의 동물에서 관찰되었다. 발작은 우리 변경, 시끄러운 소음 및 싸움과 같은 환경적 스트레스에 의해 야기 및/또는 증폭된 것으로 보인다 (참고로, 시끄러운 소음과 같은 환경 자극에 의해 유발된 명백한 치명적인 갑작 발작의 보고된 사례가 또한 TpltmlPlob 마우스 모델에서 보고되었다 (Sleat 등, 2004)). 일반적으로, Tplmlj 마우스는 줄어든 운동성, 점진적인 체중 감소, 사료 공급 불능, 부분적 및 그 다음 일반화된 떨림, 발작, 및 조기 사망률 (6-개월령까지 100% 사망률; 도 15)을 포함하여, 증상의 개시에 따른 신속한 악화를 나타냈다. 생존 곡선에서 명백한 성별-특이적 차이는 싸움으로 인해 수컷 동물에서 환경 자극-유도된 치명적 발작의 더 높은 발병률의 결과인 것으로 가정된다.

[0151] TPP1 효소적 활성은 Sohar 등에 의한 프로토콜의 변형된 버전을 사용하여 Tplmlj 마우스의 뇌 및 간에서 측정되었다 (Sohar 등, 2000). 데이터는 모든 시점에서 모든 시험된 조직에서 임의의 잔존 TPP1 활성의 부재를 확인한다 (도 16).

[0152] 피질, 해마, 뇌간, 및 소뇌를 1-, 3-, 및 5.5-개월령에서 수확하고 질환 진행의 마커로서 신경병리학 및 리소좀 저장 물질의 축적을 분석하기 위해 처리하였다. CNS 조직은 진행성 리소좀 축적 및 신경병리학을 나타내었고, 이것은 5.5-개월에 말기 질환에 의해 두드러졌다 (데이터는 도시되지 않음). 간단히, H&E 염색된 섹션에서, 뇌는 1-개월령에서 현저하지 않았다 (반면에 온건한 별아교세포증은 GFAP 면역염색 시에 이미 존재했음). 3-개월령에서, 큰 뇌간 뉴런에서 호산구 저장 물질, 피질에서 신경교증, 및 뇌의 다중 영역에서 널리 퍼진 별아교세포증을 포함하여 수많은 신경병리학의 측정치가 관측되었다. 5.5-개월령에서, 저장 병리학은 뇌 전체에 널리 퍼져 있고 두드러진 별아교세포증에 부가하여, 피라미드 피질 뉴런 및 뇌간 큰 뉴런에서 두드러졌다. 저장 물질은 특히 뇌간에서 형광 광하에서 (얼룩 없음) 쉽게 명백해졌다.

[0153] 고유 뉴런 결함 이외에도, 많은 LSD (CLN2 질환 포함함)에 공통적인 또 다른 새로운 인자는 신경염증이며, 이는 뉴런 생존에 부정적인 영향을 미치고 진행성 신경퇴행에 기여할 수 있다. 미세아교 및 별아교세포 활성화는 CNS에 영향을 미치는 많은 LSD의 특징이며, 이는 종종 최종적인 뉴런 손실이 발생할 영역을 선행하고 예측한다 (Bosch 등, 2015). 따라서, 별아교세포증의 객관적인 정량화를 가능하게 하기 위해, GFAP 염색 (즉, GFAP 점수)에 기초한 평점 체계가 개발되었다. GFAP 점수는 20x 파워 필드 당 활성화된 별아교세포 (항-GFAP 항체로 염

색됨)의 평균 수로 정의되었다. 이 천연 이력 연구에서, GFAP 점수는 해마와 피질에서 1-, 3-, 및 5.5-개월령에 계산되었다. 결과는 질환 진행과 일치하는 GFAP의 진행성 축적을 보여준다 (도 17). 별아교세포증은 (3-개월령에 검출되었던) 저장 축적 전에 관찰된 바와 같은 뉴런 저장 축적보다 신경병리학의 더 민감한 마커인 것으로 보인다. 피질과 해마에서 1-개월령 만큼의 초기에 별아교세포증의 관찰은, 비록 지갈소 축적 (면역조직화학에 의한 신호 증폭이 없는 비-특이적 염료)을 검출하는 데 사용된 방법의 민감성이 GFAP 염색이 비하여 줄어들지만, CLN2 질환에서 뉴런 사망의 일차 원인으로서 염증의 가상적 역할과 일치한다. 요약하면, Tpp1m1J 마우스 모델은 생물학적으로-관련된 CLN2 질환의 동물 모델이며 Tpp1m1Plob 마우스 (Sleat 등, 2004) 및 TPP1-null dachshund (Awano 등, 2006) 동물 모델을 포함한 다른 확립된 마우스 및 갯과 모델에 매우 유사하다. Tpp1m1j 마우스는 임상 증상의 발병 초기 연령, 비정상 표현형의 신속한 진행 및 단축된 수명뿐만 아니라 유사한 병리생리적, 생화학적 및 기능적 변화를 포함하여 인간에서 CLN2 질환의 특징적인 특징을 나타낸다. Tpp1m1j 마우스에서의 생후 첫 주 (및 짐작컨대 출생 전)에서 시작하여, TPP1 효소적 활성에서의 결핍은 뉴런의 세포질에 지갈소 과립으로도 알려진 리소좀 소화의 지질-함유 잔기의 축적에서 절정에 이른다. 뉴런의 세포질에서 지갈소 축적은 H&E 염색에 의해 밝혀지고 별아교세포 활성화 또는 별아교세포증에서의 증가 (신경-염증을 나타냄)와 관련이 있다. 후속으로, Tpp1m1j 마우스는 운동 기능 및 보행 이상, 떨림, 발작, 체중 감량 및 먹을 수 없음의 진행성 악화 및 조기 사망률을 경험한다.

[0154] A. 체중

[0155] 1×10^{11} GC의 AAV.hTPP1co 벡터를 주입한 5마리 TPP1 KO 마우스의 체중을 주입 후 약 14일마다 모니터링하였다 (도 11에 도시된 선으로 연결된 닫힌 정사각형). PBS로만 주입된 3마리 TPP1 KO 마우스는 대조군으로 하였다 (도 11에서 선으로 연결된 닫힌 원). 연구 동안 제4 TPP1 KO 마우스는 죽었고 따라서 여기서 배제하였다. AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG의 1×10^{11} GC로 처리가 KO 암컷에서 체중 증가를 증진시키는 것으로 나타나는 동안, 주입 후 4일째에서 체중은 처리된 마우스와 대조군 사이에서 비교할만하였다.

[0156] B. TPP1 효소 활성

[0157] PBS (도 10, KO +PBS, n=4) 또는 1×10^{11} GC AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG (도 10, KO +le11, n=5)가 ICV 주입된 TPP1 KO 암컷의 혈청에서 TPP1 효소 활성을 측정하였다. 실시예 3에서 기재된 바와 같이 주입이 없는 (도 10, WT, n=2) 또는 1×10^{11} GC AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG가 ICV 주입된 (도 10, WT +le11, n=2) 야생형 수컷 마우스가 정확한 비교를 위해 동시에 시험되었다.

[0158] TPP1 효소 활성을 혈청에서 측정하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 검정에 사용된 혈청의 용적으로 나눔으로써 단위/ μ L/h로 정규화하였다. AAV.hTPP1co를 주입한 후, 암컷 KO 마우스는 수컷 야생형 마우스와 대조적으로 혈청에서 상승된 TPP1 효소 활성을 나타내지 않았다 (도 10).

[0159] C. 뇌 조직학

[0160] PBS 또는 1×10^{11} GC AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG로 ICV 주사 60일 후, 동물을 안락사시키고 조직, 예컨대 뇌, 폐, 간, 근육 및 신장을 수확하였다. 뇌 샘플을 절단하고 추가의 조직학적 분석을 위해 채취하였다.

[0161] 피질 및 시상은 면역조직화학에 의해 별아교세포 활성화의 마커인, GFAP (신경교 원섬유성 산성 단백질을 위해 염색하였다. 성상세포작용으로도 알려져 있는 별아교세포 활성화는 NCL에서 뉴런 사망/손실의 일차 원인 중 하나이다. WT 동물은 피질 및 시상에서 상대적으로 적은 GFAP 염색을 나타냈다 (도시되지 않음). PBS 처리된 녹아웃은 피질 및 시상에서 극적으로 증가된 GFAP 염색을 나타냈다 (도시되지 않음). 1×10^{11} GC AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG로 처리된 녹아웃은 피질 및 시상 둘 모두에서 GFAP 염색의 개선을 나타내는 것으로 나타났다 (도시되지 않음).

[0162] D. 기능적 및 행동 테스트

[0163] a. 등지 건축

[0164] PBS (n=4) 또는 1×10^{11} GC의 AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG (n=5)가 ICV 주입된 TPP1 KO 암컷을 그룹으로 수용하였다. 동물을 새로운 우리에 다시 수용하고 우리-교체 24시간 후, 등지는 등지-건축의 정후에 대해 관찰되었다.

- [0165] PBS로 처리된 KO 암컷은 그들의 등지를 쫓고 등지를 건축하는 최소의 징후를 보였으며, 이는 Peter Lobel 모델에서 Ron Crystal에 의해 기재된 관찰과 일치한다. AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG의 1×10^{11} GC로 처리된 KO 암컷은 그들의 등지를 쫓고 정상적인 등지를 건축하여, 마우스의 정상 거동에서의 개선을 입증했다. 등지 건축 테스트는 정량적 목적으로 더 많은 마우스에 대해 수행된다.
- [0166] b. 요동 로타로드 테스트
- [0167] PBS (n=4) 또는 1×10^{11} GC의 AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG (n=5)가 ICV 주입된 TPP1 KO 암컷은 하기 프로토콜에 따라 요동 로타로드 시험을 거쳤다.
- [0168] 로타로드 테스트를 위해, 마우스를 연속 4일 동안, 한 번의 습관화 및 요동 로타로드 기간과 그 다음 3번의 후속적인 훈련 기간 (운동 학습 및 요동 로타로드 포함)으로 로타로드에 노출시켰다. "실패"에 대한 대기시간에서의 증가는 학습이 발생했음을 나타낸다. 훈련과 시험하는 날의 기간은 오전 8시에서 오후 12시로 동일하게 유지되었다. 첫날에는, 마우스가 장비에 익숙해지도록 일정한 저속 (5 rpm)으로 2번의 시험이 수행되었다. 마우스를 5 rpm에서 120초 동안 작동하는 로타로드에 배치하였다. 마우스가 떨어지면 동물을 막대에 다시 놓았다. 2번의 시험 사이에 2분의 휴식이 허용되었다. 로타로드는 5 rpm에서 일정한 속도 모드로 설정되었다. 같은 날에, 요동 로타로드 기간이 습관화 직후 개시되었다 (사이에 2분 휴식이 허용되었음). 로타로드는 총 180초 동안 매 다른 회전마다 역 회전으로 10 rpm으로 설정되었다. 마우스가 떨어지거나 180초 후일 때 시험이 종결되었다. 3분의 시험 사이 간격 (ITI) 후, 제2의 시험이 수행되었다. 또 다른 3분의 ITI 후, 제3 및 마지막 시험이 수행되었다. 로타로드 설정은 1회 전체 회전 후 역 회전으로 10 rpm에서 요동 방식으로 설정되었다.
- [0169] 3개월령 동물은 주사 일 (D0)뿐만 아니라 주사 후 60일째 (약 5개월령, D60)에 시작하여 시험되었다. 각각의 마우스는 D0에서 3번, D60에서 3번 시험되었다. 각각의 그룹에 대해 로타로드에 소비된 시간이 초 단위로 측정되는 낙하에 대한 평균 대기시간을 도 12A에 플롯팅하였다. PBS (KO + PBS, 도 12A에서 선으로 연결된 닫힌 원, n=4)와 AAV.hTPP1co 처리된 KO (KO + 1×10^{11} GC, 도 12A에서 선으로 연결된 닫힌 정사각형, n=4) 사이에 D60에서 유의차는 관찰되지 않았다.
- [0170] c. 가속 로타로드 테스트
- [0171] PBS (n=4) 또는 1×10^{11} GC의 AAV9.CB7.CI.hCLN2co.RBG (n=5)가 ICV 주입된 TPP1 KO 암컷은 하기 프로토콜에 따라 가속 로타로드 시험을 거쳤다.
- [0172] 마우스를 연속 4일 동안, 한 번의 습관화 및 요동 로타로드 기간과 그 다음 3번의 후속적인 훈련 기간 (운동 학습 및 가속화된 로타로드 포함)으로 로타로드에 노출시켰다. "실패"에 대한 대기시간에서의 증가는 학습이 발생했음을 나타낸다. 훈련과 시험하는 날의 기간은 오전 8시에서 오후 12시로 동일하게 유지되었다. 첫날에는, 마우스가 장비에 익숙해지도록 일정한 저속 (5 rpm)으로 2번의 시험이 수행되었다. 마우스를 5 rpm에서 120초 동안 작동하는 로타로드에 배치하였다. 마우스가 떨어지면 동물을 막대에 다시 놓았다. 2번의 시험 사이에 2분의 휴식이 허용되었다. 로타로드는 5 rpm에서 일정한 속도 모드로 설정되었다. 제2 내지 제4 일에 마우스를 가속화된 로타로드에 노출시켰다. 로타로드는 300초에 걸쳐 5rpm에서 40rpm으로 가속되도록 설정되었다. 마우스가 떨어졌을 때 시험이 종결되었고, 매달린 동안 또는 300초 후에 한 번의 수동적인 회전이 완료되었다. 5분의 ITI 후, 제2의 시험이 수행되었다. 또 다른 5분의 ITI 후, 제3 및 마지막 시험이 수행되었다. 이 기간 동안, 로타로드는 300초 동안 5에서 40 rpm으로 가속화된 램프 모드로 설정되었다.
- [0173] 3개월령 동물은 주사 일 (D0)뿐만 아니라 주사 후 60일째 (약 5개월령, D60)에 시작하여 시험되었다. 각각의 마우스는 D0에서 3번, D60에서 3번 시험되었다. 각각의 그룹에 대해 로타로드에 소비된 시간이 초 단위로 측정되는 낙하에 대한 평균 대기시간을 도 12B (D0) 및 12C (D60)에 플롯팅하였다. 개선된 학습은 D60 테스트 동안 AAV.hTPP1co 처리된 KO에서 제2 훈련 일에 관찰되었다.
- [0174] 실시예 5: 용량 효능
- [0175] 실험은 다양한 용량에서 AAV.hTPP1co 주사의 효능 및 독성을 평가하기 위해 수행되었다. TPP1 녹아웃 (KO) 마우스 및 야생형 마우스를 임의로 제공된 음식/물과 함께 12-시간 광/12-시간 암 주기로 유지시켰다. 1개월령의 TPP1 KO 마우스에 뇌심실내 투여를 통해 상기 기재된 AAV.hTPP1co의 3×10^9 (저용량) 또는 3×10^{11} (고용량) GC를 주사하였다. TPP1 KO 및 야생형 마우스에 PBS를 또한 주사하고 대조군으로서 하였다. 각각의 그룹은 10마리의 수컷 및 10마리의 암컷 동물을 포함하였다. 시험된 마우스의 생존 및 체중을 모니터링하고 기록하였다.

뇌, CSF, 혈청 및 간으로부터 샘플의 TPP1 효소 활성을 측정하였다. 뇌 조직학, 예컨대 GFAP 발현에 의해 평가된 지갈소 오토-형광 및 별아교세포증이 평가되었다. 기능적 및 행동 테스트, 예컨대 운동 협응 검정이 수행되었다. 게다가, 항-TPP1 면역 반응이 또한 평가되었다.

[0176] A. 생존 곡선 및 체중

[0177] 생존을 매일 모니터링하고 체중이 20% 감소하면 동물을 안락사시켰다. 생존 곡선은 도 4A에 플롯팅되었고 반면, 각각의 시험된 그룹에 대한 중앙 생존 주가 계산되고 도 4B에 열거되었다. 고용량 처리된 동물의 사망은 관찰 기간 동안 1마리 암컷을 제외하고는 감지되지 않았다. 모든 저용량 처리된 동물과 처리되지 않은 KO는 죽은 것으로 밝혀졌다. 수컷 KO 마우스의 중앙 생존 주는 15였고 반면에 암컷 KO 마우스는 24-주 평균 중앙 시간을 실증했다. 3×10^9 GC의 AAV.hTPP1co 처리된 KO 마우스에서, 수컷의 중앙 생존은 16주 였고 반면에 암컷 중 하나는 19주였다 (도 4B).

[0178] 고-용량에서 AAV9.CB7.hCLN2 투여된 동물은 야생형 대조군과 비교하여 운동 학습 (소뇌 기능)의 정규화를 나타냈을뿐만 아니라 극적으로 증가된 생존율을 나타냈다 (주사 후 30주에서 85% 생존율 대 대조군 동물에서 0% 생존율) (도 4A'). 저-용량 및 대조군 동물 둘 모두에서 ~17의 관측된 중앙 생존율로, 저-용량 (7.5×10^9 GC/g 뇌 질량)으로 AAV9.CB7.hCLN2를 투여한 Tpp1mlj 마우스에서 생존 또는 다른 생물활성의 측정치에는 이점이 있는 것으로 보이지 않았다.

[0179] 상기 기재된 모든 시험된 동물의 체중을 도 5에 플롯팅하였다. 고용량 처리된 동물은 KO에 비해 중간 정도의 체중 감소를 나타냈다.

[0180] B. 운동 협응 검정

[0181] NCL은 CNS 질환이며 뉴런 사망은 운동성에 영향을 준다. 질환 표현형을 평가하기 위해, 실시예 4에 기재된 바와 같이 마우스를 로타로드 상에서 운동 협응에 대해 시험하였다. 마우스는 이 프로토콜에 대해 1개월령의 나이 이후 3주마다 숙련되었다. 로타로드 상에서 소비된 시간을 초 단위로 측정된 낙하 대기시간이 기록되었다. 요법 후 90일에 시작한 시험의 3일째에 시험 3의 결과를 도 6에 플롯팅하였다. 처리되지 않은 것과 고용량 처리된 KO 사이의 유의차가 관찰되는 반면, WT와 고용량 처리된 KO 사이의 동일한 신체적 능력이 관찰되었다. 이들 결과는 고용량 요법이 TPP1 KO 마우스에서 질환 표현형을 보상한다는 것을 실증하였다.

[0182] C. 항-TPP1 면역 반응

[0183] 상기 기재된 AAV.hTPP1co의 독성 및 효소 정정을 평가하기 위해, TPP1에 대한 면역 반응을 평가하였다. ICV 주사 후 70일에, 본 실시예에서 상기 기재된 3.3개월령 마우스를 출혈시켰다. 생성된 혈청을 TPP1 단백질에 대한 면역 반응을 평가하기 위해 항-TPP1 항체의 존재에 대해 시험하였다.

[0184] 면역 반응은 아래에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 측정되었다. pH 7.5에서 TPP1 단백질을 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 의 최종 농도로 규칙적 PBS에 희석시켰다. ELISA 플레이트를 코팅하기 위해, $50 \mu\text{L}$ 의 희석된 TPP1을 각각의 웰에 장입하고, 피복된 플레이트를 밤새 냉장실에서 유지시켰다. 완충액 B를 통한 5회 세정을 다음 날 플레이트 세척기에서 수행하였다. $200 \mu\text{L}$ 의 차단 용액 (PBS에 희석된 소과 혈청 알부민 (BSA) 2% (100 ml 당 2g))을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 최소 1시간 동안 인큐베이션하여 플레이트의 비특이적 결합 부위를 차단하였다. 플레이트를 뒤집고 격렬하게 흔들어 차단 용액을 제거하였다. 수집된 혈청을 규칙적인 PBS에서 천 회 희석하고, 각각의 웰에 이러한 희석된 혈청 $50 \mu\text{L}$ 를 장입하였다. PBS 단독 웰은 음성 대조군으로 제공되는 반면에 양성 샘플은 1/10, 1/30, 1/90, 1/270, 1/810, 1/2430 및 1/7290로 희석되어 표준 곡선을 생성하였다. 각각의 시험된 혈청에 대해 중복 또는 삼중을 수행하였다. 실온에서 2-시간 인큐베이션 후, 완충액 B로 5회 세정을 플레이트 세척기에서 수행하였다

[0185] 항-TPP1 IgG를 시험하기 위해, HRP 접합된 염소 항 마우스 IgG 항체인 일차 항체를 차단 완충액에서 1:10,000으로 희석시켰다. $100 \mu\text{L}$ 의 제조된 일차 항체를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 완충액 B로 5회 세정을 플레이트 세척기에서 수행하였다. $150 \mu\text{L}$ HRP 기질 (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘, TMB)을 각각의 웰에 장입하였다. 암실에서 1 내지 30분 인큐베이션하여 검출가능한 색이 발달하도록 하였다. 필요하면 온화한 피펫팅으로 $50 \mu\text{L}$ 정지 완충액 (황산)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트 판독기를 사용하여 450nm에서 신호를 측정하였다.

[0186] 항-TPP1 IgM을 검출하기 위해, 상기에 기재된 바와 동일한 프로토콜을 다음과 같은 변형으로 수행하였다. 일차

항체는 염소 항 마우스 IgM이었다. 일차 항체로 인큐베이션 후, 완충액 B로 5회 세정을 수행하고 이어서 차단 완충액 중에 1:10,000으로 희석된 100 μ l HRP 접합된 항-염소 이차 항체로 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0187] 저용량 처리된 수컷 및 암컷 KO 마우스 및 고용량 처리된 암컷 마우스 둘 모두는 TPP1에 대해 강한 면역 반응을 나타냈으며 (도 7A), 이 면역 반응은 치료적 용량과 무관함을 입증한다. 고용량의 AAV.hTPP1co 벡터로 처리된 수컷 KO는 중간 정도의 면역 반응을 나타냈다. 동일한 혈청에서 수반되는 TPP1 효소적 활성을 실시예 2 및 4에 기재된 바와 같이 측정하고 도 7B 및 도 20에 플롯팅하였다. 효소 활성은 항-TPP1 항체의 존재와 역의 상관관계가 있었다. 그럼에도 불구하고, 실시예 5에 나타난 바와 같이, 수컷 및 암컷 고용량 사이에서 치료적 효능에서의 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 항 TPP1 면역 반응의 부정적인 영향이 없음을 시사한다.

[0188] D. TPP1 효소 활성

[0189] 다른 기관에서의 TPP1 효소적 활성을 평가하기 위해서 뿐만 아니라 감염된 조직 (대부분 뇌)에서 효소 정정을 평가하기 위해, TPP1 효소 활성을 실시예 2 및 4에 기재된 바와 같이 측정하였다. 뇌 조직, 예컨대 피질 및 측면 심실 (LV), 해마 및 시상하부의 일부를 포함하는 섹션 (도 9에서 LV 부분으로 표시됨)을 실시예 4에 기재된 바와 같이 수확, 해부 및 가공하였다. 3-개월령의 수컷 및 암컷 TPP1 KO 마우스에서 TPP1 활성이 관찰되지 않았고, 따라서 1-개월령의 야생형 마우스가 정상적이고 검출가능한 수준의 TPP1 활성을 실증하지만 KO에서 잔존 TPP1의 완전한 부재를 입증하는 기준선으로서 사용하였다 (도 8). 야생형 마우스뿐만 아니라 PBS 단독이 주입된 KO에서의 소뇌 및 간을 비롯하여 다른 기관에서 유사한 결과가 관찰되었다 (도 9). 상기 기재된 AAV.hTPP1co의 3×10^{11} GC로 처리된 TPP1 효소 활성을 또한 측정하고 비교를 위해 도 9에 플롯팅하였다. 시험된 3가지 다른 기관 (LV 부분, 소뇌 및 간)에서, 고용량 벡터 처리된 KO는 야생형보다 더 많은 TPP1 활성을 제공하는 반면, PBS를 주입한 KO의 TPP1 활성 수준은 낮게 유지되었고, 따라서 도 9에 도시된 모든 샘플로부터 공제되어, 이는 hAAV.hTPP1co로 처리된 KO 마우스에서 성공적인 세포 효소적 정정 및 건강한 표현형을 입증하였다.

[0190] 고-용량 동물에서, TPP1 효소적 활성 (AAV9.CB7.hCLN2에 의해 인코딩된 효소)은 주사후 30주에서 대뇌, 소뇌, 및 간에서 과생리적 수준으로 증가되었다 (도 20).

[0191] E. 조직학적 분석

[0192] 뇌에서 AAV.hTPP1co의 ICV 주사의 생물활성 및 효능을 평가하기 위해, 시험된 마우스의 뇌 샘플을 면역조직화학을 통해 활성화된 별아교세포/별아교세포증의 마커인 GFAP에 대해 염색하였다. 이미지는 도시되지 않음. 1-개월령 야생형 마우스의 피질 및 시상하부 둘 모두는 GFAP를 나타내지 않았지만, KO 동물의 상응하는 샘플은 1개월령에서 별아교세포증으로 관찰되었으며, 이는 별아교세포가 TPP1 돌연변이로 인한 뉴런에서 지질의 축적에 의해 활성화되었고 이러한 별아교세포증 진행은 1개월령 또는 그 보다 빨리 개시되었음을 나타낸다. KO 마우스에서, 별아교세포증은 성장에 의해 증가를 유지했다. 3개월령에, KO 마우스에서 피질 및 시상하부 둘 모두에서 추가의 상승된 수준의 GFAP가 검출되었다. 도 4에 도시된 생존 곡선에서, KO 동물의 사망은 3.5개월령에서 시작하는 것이 관찰되었고, 이는 NCL 환자 및 동물 모델의 뇌의 다른 부분에서 관찰된 활성화된 별아교세포와 뉴런 사멸 사이의 보고된 관련성과 일치한다. 따라서, 이 신경 손실은 KO에서 관찰된 떨림 및 운동 협응 비정상적 질환 표현형을 부여하였다. 이 결론은 PBS를 주입한 3.5개월령 KO 마우스의 측면 심실에 인접한 해마 섹션에서 GFAP 면역염색을 통해 관찰된 대규모 별아교세포증에 의해 추가로 지지되었고, 실시예 4에 기재된 바와 같이 사망한 것으로 밝혀졌다.

[0193] 게다가, GFAP 염색은 PBS를 주입한 야생형 및 KO 마우스뿐만 아니라 상기 기재된 AAV.hTPP1co의 1×10^{11} GC로 처리된 KO 동물의 뇌 샘플을 사용하여 4.5개월령에서만 수행되었다. AAV.hTPP1co 처리된 마우스의 뇌는 야생형과 유사한 관찰로 별아교세포증이 제거되었으며, 이는 AAV.hTPP1co 요법이 제어될뿐만 아니라 활성화된 별아교세포를 적극적으로 억제함을 나타낸다. 별아교세포증의 정량화가 수행된다. 고-용량 동물에서, 뇌 뉴런은 주사후 30주에서 별아교세포증 (신경염증의 마커) 기질의 리소좀 축적에서 정정을 나타냈다 (도 9).

[0194] 상기를 고려하여, TPP1 KO 마우스의 효소 활성 및 생리적 표현형은 AAV.CB7.CI.hTPP1co.RBG의 투여를 통해 성공적으로 회복되었다.

[0195] 실시예 6: 제조

[0196] 간단히, 주세포 은행 (MCB)으로부터의 HEK293 세포는 3개 플라스미드로 형질감염되어 포장된 벡터 게놈을 생성한다: CLN2 발현 카세트를 함유하는 플라스미드 및 AAV9 캡시드 단백질 및 복제 요소를 인코딩하는 2개의 헬퍼 플라스미드. 바이러스 벡터 생성물을 함유하는 세포 배양 상청액을 수확하고, 정화하고, 집선 유동 여과 (TFF)

에 이어서 친화도 및 음이온 교환 (AEX) 크로마토그래피에 의해 농축시킨다. AEX 분획을 모으고 TFF를 반복하여 최종 제형 완충액으로 농도 (TFF를 통해 희석 또는 농축)를 조정하고 이어서 멸균 여과 및 바이알에 충전함으로써 의약품이 생산되는 정제된 벌크단위 약물질 (BDS)을 생성한다. AAV9.CB7.hCLN2 BDS 및 최종 의약품 (FDP) 제조 공정은 현행 우수 제조 관리 (cGMP)를 사용하여 계약 제조 조직화 (CMO)에서 수행되어 BDS 및 FDP의 안전성, 동일성, 품질, 순도, 및 효력을 보장할 것이다.

[0197] 세포 배양 및 수확

[0198] 세포 배양 및 수확 제조 공정은 4개 주요 제조 단계를 포함한다: 세포 씨딩 및 팽창, 일시적 형질감염, 벡터 수확, 및 벡터 정화. 이들 처리 단계는 개요 과정 흐름 선도에 묘사되어 있다.

[0199] 세포 씨딩 및 팽창: 자격이 있는 HEK293 세포주가 생산 공정에 사용된다. MCB는 WuXi AppTec에서 생산되었고 완전하게 특성구명되었다. 벡터 생산을 위해 사용된 세포 배양은 단일의 해동된 MCB 바이알에서 개시하여 팽창된다. 세포는 T-플라스크 및 10-층 세포 배양 챔버 (CS-10)를 사용하여 대략 1.4×10^{10} 세포의 총 생존가능 세포 수를 달성하도록 팽창된다. 배양은 점점 더 큰 표면적 ($1 \times T-75$, $4 \times T-225$, $2 \times CS-10$ 및 $14 \times CS-10$)을 사용하여 4 단계로 팽창된다. 제1 단계에서 세포는 합류할 때까지 3-4일 동안 성장되고 그 다음 다음 단계로 계대된다. 후속적인 단계에서, 세포는 4-5일 동안 성장되고, 그런 다음 계대배양된다. 이 팽창은 BDS 로트 당 벡터 생산을 위해 최대 50개의 36-층 세포 배양 용기 (HS-36)를 씨딩을 위해 충분한 세포 질량이 생성되도록 한다. 세포는 팽창 과정 전체에 걸쳐 10% 감마선 조사된 미국-공급 우태 혈청 (FBS)이 보충된 둘베코 변형된 이글 배지 (DMEM)로 구성된 배지에서 배양된다. 이용된 세포는 정착 의존적이고 세포 분해는 동물성 제품-프리 세포 해리 시약인 TrypLE Select를 사용하여 달성된다. 세포 씨딩은 멸균, 단일-사용 일회용 바이오프로세스 백 및 튜우빙 세트를 사용하여 달성된다. 세포는 5% ($\pm 0.5\%$) CO₂ 분위기에서 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)로 유지된다. 바이알 해동에서 50 HS-36의 집종까지의 총 처리 시간은 15-20일이다.

[0200] 일시적 형질감염: 4일의 성장 (DMEM 배지 + 10% FBS) 후, HS-36 세포 배양 배지를 신선한, 무혈청 DMEM 배지로 대체하고 최적화된 폴리에틸렌이민 (PEI)-계 형질감염 방법을 사용하여 3개 생산 플라스미드로 형질감염한다.

[0201] 충분한 DNA 플라스미드 형질감염 복합체가 생물학적 안전성 캐비닛 (BSC)에서 제조되어 최대 50개 HS-36 (BDS 배치당)을 형질감염시킨다. 초기에, 7.9 mg의 pAAV.CB7.CI.CLN2.RBG.KanR 벡터 게놈 플라스미드, 158 mg의 pAdDeltaF6, 79 mg의 pAAV29KanRGXRep2 AAV 플라스미드 및 PEI (PEIPro, PolyPlus Transfection SA)를 함유하는 DNA/PEI 혼합물이 제조된다. 혼합 후, 용액을 실온에서 25분 동안 방치하고, 그 다음 무혈청 배지에 첨가하여 반응을 쉼시킨 후 HS-36에 첨가하였다. 형질감염 혼합물을 HS-36의 모든 36개 층들 사이에서 균등화시키고, 세포를 5% ($\pm 0.5\%$) CO₂ 분위기에서 37°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)에서 5일 동안 인큐베이션한다.

[0202] 벡터 수확: 세포 배양 상청액은 상청액을 일회용 바이오프로세스 백에 무균처리로 펌핑하여 HS-36으로부터 수확된다. 수집 후, 수확 물질에 MgCl₂를 2 mM의 최종 농도로 보충하고 (벤조나제에 대한 보조인자), 벤조나제 뉴클레아제를 ≥ 25 단위/mL의 최종 농도로 첨가한다. 형질감염 과정의 결과로서 수확물에 존재하는 잔존 세포 및 플라스미드 DNA의 효소 소화를 위한 충분한 시간을 제공하기 위해 수확 물질 (일회용 바이오프로세스 백 내)을 37°C에서 2시간 동안 혼합 및 인큐베이션한다. 이 단계는 최종 벡터 의약품에서 잔존 DNA의 양을 최소화하기 위해 수행된다. 인큐베이션 기간 후, NaCl을 500 mM의 최종 농도로 첨가하여 소화를 종료하고 여과 및 다운스트림 접선 유동 여과 (TFF) 동안 생성물의 회수를 돕는다.

[0203] 벡터 정화: 세포 및 세포 잔해는 멸균, 폐쇄된 튜우빙 및 연동 펌프에 의해 유도된 백 세트로 직렬식으로 연결된 Sartoguard 폴리에테르설폰 (PES) 캡슐 필터 ($1.2/0.2 \mu\text{m}$; Sartorius Stedim Biotech Inc.)를 사용하여 벤조나제-처리 수확 물질에서 제거된다. 생체부담 감소 여과는 필터 트레인의 말단에, 업스트림 생산 공정 중에 잠재적으로 도입된 생체부담이 다운스트림 정제 전에 감소되도록 보장한다.

[0204] 벡터 정제 공정

[0205] 정제 공정은 하기에 상세히 기재되는 4가지 주요 제조 단계를 포함한다: TFF에 의한 농축 및 완충액 교환, 친화성 크로마토그래피, 음이온 교환 크로마토그래피 및 TFF에 의한 농축 및 완충액 교환.

[0206] 접선 유동 여과에 의한 농축 및 완충액 교환: 정화된 생성물의 용적 감소 (10-배)는 구입 멸균, 폐쇄된 생물공정 튜우빙, 백 및 막 세트를 사용하여 TFF에 의해 달성된다. TFF의 원리는 적합한 다공성 (100 kDa)의 막에 평행한 압력 하에서 용액을 유동시키는 것이다. 차압은 막 기공보다 큰 분자를 유지하면서 막을 통해 그리고 효과적으로 폐기물 스트림으로 더 작은 크기의 분자를 유도한다. 용액을 재순환시킴으로써, 병류는 막 표면을 청소하여 막 기공 오염을 방지한다. 적절한 막 기공 크기 및 표면적을 선택함에 의해, 원하는 분자를 유지하고 농축

시키면서 액체 샘플이 용적에서 빠르게 감소될 수 있다. TFF 적용에서의 정용여과는 액체가 막을 통과하여 폐기물 스트림으로 통과하는 것과 동일한 속도로 재순환 샘플에 신선한 완충액의 첨가를 포함한다. 정용여과의 용적이 증가함에 따라, 소분자의 증가하는 양은 재순환하는 샘플에서 제거된다. 이것은 정화된 생성물의 완전한 정제를 초래하지만, 또한 후속적인 친화성 컬럼 크로마토그래피 단계와 양립가능한 완충액 교환을 달성한다. 따라서, 100 kDa인 PES 막은 농축에 사용되고, 그런 다음 20 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.5로 구성된 ≥ 3.3 용적의 완충액으로 정용여과된다. 정용여과된 생성물은 그런 다음 2 내지 8°C에서 ≥ 16 시간 동안 저장되고 그 다음 1.2/0.2 μm 깊이 필터 캡슐로 추가로 정화되어 임의의 침전된 물질을 제거한다. 수확, 정화 및 농축 단계에 대한 처리 시간은 대략 2일이다.

[0207] 친화성 크로마토그래피: 정용여과된 생성물은 후속으로 AAV9 혈청형을 효율적으로 포착하는 POROS® CaptureSelect® AAV9 친화성 매트릭스 (Life Technologies)에 적용된다. 이들 이온성 조건 하에서, 상당한 백분율의 잔류 세포 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해 흐르고, 반면에 AAV9 입자는 효율적으로 포착된다. 적용 후, 칼럼을 2개 완충액 (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.5 및 20 mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.5)을 사용하여 세정하여 추가의 공급물 불순물을 제거한 후 낮은 pH 단계 용출 (400 mM NaCl, 20 mM 나트륨 시트레이트, pH 2.5)이 이어진다. 용리액은 용리액의 10% 용적으로 중화 완충제 (200 mM 비스 트리스 프로판, 0.01% 플루론산 F68, pH 10.2)를 첨가함에 의해 즉시 중화된다. 친화성 크로마토그래피 단계에 대한 처리 시간은 1일 미만이다. 공정 중간체는 추가 처리 이전에 2-8°C에서 밤새 유지될 수 있다.

[0208] 음이온 교환 크로마토그래피: 비어있는 AAV 입자를 포함하는 공정중 불순물의 추가의 감소를 달성하기 위해, 음이온 교환 크로마토그래피 단계가 사용된다. 이 단계를 위해, POROS-AAV9 용출 풀은 50-배 (20 mM 비스 트리스 프로판, 0.001% 플루론산® F68, pH 10.2)로 희석하여 CIMmultus QA 모노리스 매트릭스 (BIA Separations)에 결합할 수 있도록 이온 강도를 줄인다. 저-염 세정 (20 mM 비스-트리스 프로판, 10 mM NaCl, pH 10.2) 후, 벡터 생성물은 60-칼럼 용적 (CV) NaCl 선형 염 구배 (20 mM 비스 트리스 프로판 내 10-190 mM NaCl, 0.001% 플루론산 F68, pH 10.2)를 사용하여 용출된다. 이 얇은 염 구배는 벡터 계층을 함유하는 입자 (전체 입자)로부터 벡터 계층이 없는 캡시드 입자 (비어있는 입자)를 분리하여 전체 캡시드에 대해 풍부한 제제를 생성한다. 3.7% 용적의 1 M 비스 트리스, 0.27% 플루론산 F68, pH 6.3을 함유하는 백에 분획을 수집하여 백에 대한 비-특이적 결합 및 높은 pH에 대한 노출의 길이를 각각 최소화한다. 적절한 피크 분획이 수집되고 풀링된다. 음이온 교환 크로마토그래피 단계에 대한 처리 시간은 1일 미만이다. 공정 중간체는 추가의 처리 이전에 2-8°C에서 밤새 유지될 수 있다.

[0209] 중공 섬유 접선 유동 여과에 의한 농축 및 완충액 교환: 풀링된 음이온 교환 중간체는 TFF를 사용하여 농축되고 완충액 교환된다. 이 단계에서, 100 kDa 막 중공 섬유 TFF 막이 사용된다. 단계 동안, 생성물을 결정된 목표 농도로 만든다. 이 농축 단계 후, 4가지 용적의 제형 완충액으로 정용여과에 의해 완충액 교환이 달성된다. 0.45/0.22 μm 여과 후 BDS 시험을 위해 샘플을 제거한다. 농축 및 완충액 교환 단계를 위한 처리 시간은 1일 미만이다.

[0210] 충전 및 저장: 여과 및 샘플링 후, BDS는 폴리프로필렌 병 안에 채워지고 FDP 처리를 위해 방출될 때까지 격리 위치에서 $\leq -60^\circ\text{C}$ 에서 냉동 저장된다.

표 1. AAV9.CB7.hCLN2 부형제에 대한 AAV9.CB7.hCLN2에 대한 제안된 제형

제안된 제형	(mM)
염화나트륨	150
염화마그네슘	1.2
염화칼륨	3
염화칼슘	1.4
인산나트륨	1
덱스트로스	4.4
폴록사머 188	0.001%

[0211]

[0212] 해동 및 풀링: BDS의 냉동된 분취액을 실온에서 해동시킨다. 다중 BDS 배치는 와류를 통해 풀링 및 혼합될 수 있다. 해동된 BDS는 2-8°C에서 밤새 유지될 수 있다

[0213] TFF 또는 희석에 의한 선택적인 농축: BDS는 중공 섬유 TFF를 사용하여 농축될 수 있거나, 제형 완충액으로 희

석되어 원하는 농도 (GC/mL)를 달성할 수 있다. 선택적인 농축 단계는 100 kDa 중공 섬유 TFF 막을 갖는 TFF를 사용하여 수행되고, BDS 공정에서 중공 섬유 TFF 농도 단계와 동일하다. 농축된 DP 중간체는 2-8℃에서 밤새 유지될 수 있다.

[0214] 멸균 여과: DP 중간체의 생체부담 샘플을 여과 직전에 취한다. DP는 사전-멸균된 어셈블리를 사용하여 0.22 μ m 여과된다. 0.22 μ m 필터 (플루오로다인 II가있는 Pall miniKleenpak 20)를 제형 완충액으로 씻어 낸 다음 배출시켰다. 이어서 DP 중간체를 여과하고, 필터 제조사에 의해 시험된 사용 전 완전성인 필터는 DP를 바이알에 충전하기 전에 사용 후 완전성이 시험된다. 필터가 사용 후 완전성 시험에 실패하면, 여과된 중간체는 다른 필터를 사용하여 다시 여과될 수 있다.

[0215] 충전, 저장, 및 수송: 여과된 DP는 연동 펌프를 사용하여 CZ 바이알에 충전된다. 초기 바이알은 시험에 최적화된 용적으로 채워질 것이다 (예를 들어 10 mL 바이알에 1 mL). 이들은 멸균, 내독소 및 기타 방출 또는 안정성 테스트에 대해 사용될 것이다. 충전 용적은 다음 바이알의 세트에 대해 증가할 것이고 (예를 들어 10 mL 바이알에 5 mL), 이것은 병상에서 사용될 것이다. 최종 바이알의 세트는 보다 낮은 용적으로 다시 채워질 것이고 (예를 들어 10 mL 바이알에 1 mL), 멸균, 내독소 및 기타 방출 또는 안정성 테스트에 사용된다. 중량 점검은 사전-정의된 간격으로 수행된다. 바이알을 캡핑하고 크리핑하고, 그런 다음 100% 시각적으로 점검되고, 라벨링되고, 카트에 포장되고, 그리고 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동된다.

[0216] 임상 현장으로 운송하기 위해, 이전에 카트에 포장된 FDP 바이알은 온도 로거가 있는 사전-인증된 판지 선적 박스에 배치된다. 박스에는 드라이아이스가 채워져 $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 의 선적 온도를 유지한다. 수송의 수령시, 온도 로거를 감독하여 선적 동안에 온도 편위가 없는지를 확인한다.

[0217] 실시예 7: 미래 연구

[0218] 제안된 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 (해부학적 제약으로 인해) 7.5 x 10¹¹ GC/g 뇌 질량의 최대 실행가능한 용량 (MFD)으로 2 x 10¹⁰ GC/g 뇌 질량의 용량 수준 범위에서 4주령 마우스에 ICV 주사를 통해 투여될 것이다. 동물의 절반은 대조군 동물에서의 기대된 신경병리학 및 사망률과 일치하도록 주사 후 60일에 희생될 것이고 TPP1 효소적 활성, 리소좀 저장 물질의 축적 및 저장 병리학, 및 별아교세포증을 포함한 생물활성에 대해 평가될 것이다. 동물의 나머지는 질환 표현형 (임상 관찰에 따라 멸립 및/또는 보행 비정상에 의해 정의됨)의 개시까지의 시간에 대해 평가될 것이고, 주사후 최대 210일 동안 장기간 생존이 따르고, 이는 대조군 동물에서 100% 사망률이 기대되는 때를 넘어서는 것이다.

[0219] AAV9.CB7.hCLN2는 파일럿 연구에서 수행된 바와 같이, 제안된 연구에서 ICV 주사를 통해 Tpp1m1j 마우스에 투여될 것이며, 이는: i) IC 주사가 해부학적 제약 및 동물 복지 문제로 인해 Tpp1m1j 마우스에서 실행가능하지 않고; 그리고 ii) 마우스에서 ICV 주사 및 갯과, 돼지, 및 비-인간 영장류 (NHP)에서 IC 주사에 이어 AAV 9 벡터-기반 생성물의 체내분포 (BD) 및 이식유전자 발현 프로파일이 비교할만한 것으로 밝혀졌기 때문이다 (Haurigot 등, 2013; Hinderer 등, 2017; McLean 등, 2014; 비공개된 데이터) (부문 3.4.2.5 참고). 중요하게는, 이들 유사성은 벡터 BD의 일차 표적 조직과 CNS (뇌, 척수) 및 주변 조직 (간, 비장)에서 후속적인 이식유전자 발현을 포함되며, 이는 표적 및 비-표적 조직 둘 모두에서 이식유전자 발현/과-발현의 평가를 가능하게 한다. 따라서, AAV9.CB7.hCLN2의 ICV 주사 후 Tpp1m1j 마우스에서 생성된 약리학 데이터는 표적 환자 모집단에서 임상 시나리오 및 계획된 IC ROA와 관련이 있다.

[0220] 실시예 8: 전임상 연구

[0221] AAV9.CB7.hCLN2에 대한 제안된 전임상 시험 프로그램은 CLN2 질환의 Tpp1m1j 마우스 모델에서 수행된 하이브리드 약리학/독성학 연구를 포함한다. 다중 용량 수준으로 ICV 주사를 통해 AAV9.CB7.hCLN2가 투여된 마우스는 아래와 같이 다중 시점에서 안전성에 대해 평가될 것이다:

[0222] • 임상 관찰 (케이지-측면, 매일)

[0223] • 체중 (매주)

[0224] • 임상 병리학 (d60, d90, d210)

[0225] • 혈청에서 체액성 면역 반응 (혈청에서 항-hTPP1 항체, ELISA) (기준선, d14, d60, d210)

[0226] • 장기 중량 (d60, d90, d210)

[0227] • 조직의 포괄적인 목록의 총 병리학 및 조직병리학 (d60, d90, d210)

- [0228] 일반적으로, 하이브리드 연구 디자인은, 임상 환경에서 생성물의 안전성 및 생물활성에 영향을 줄 수 있는, 표적 환자 모집단의 국소 미세환경 및 병리생리학 상태를 재현하는 질환 환경에서 시험품의 안전성의 평가를 용이하게 한다. 따라서 제안된 하이브리드 약리학/독성학 연구로부터 생성된 안전성/독성 데이터는 AAV9.CB7.hCLN2의 안전성 프로파일에 관한 중요한 정보를 제공할 것으로 기대된다. 에이전시 안내 권고에 따르면, "생물활성 및 안전성의 평가를 위해 선택된 동물 종은 임상시험 디자인을 안내하는 데이터를 생성하기 위해 인간에서 예상되는 것과 유사한 시험품 [생성물]에 대한 생물학적 반응을 입증해야 한다". 따라서, CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델의 선택은 AAV9.CB7.hCLN2의 안전성의 평가에 적절하다.
- [0229] 이환 Tpp1mlj 마우스에서의 기본 병리학 및 조기 사망률은 잠재적인 시험품-관련된 효과를 숨길 수 있고 일부 안전성 평가 (예컨대 연속 출혈)를 수행하기 위한 능력은 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 Tpp 1mlj 마우스의 감수성에 기인하여 제한될 수 있다는 우려를 포함하여 Tpp1mlj 마우스의 안전성을 평가하는 일부 잠재적인 어려움이 있다. 이들 우려가 경험에서 나온 것이고 Tpp1mlj 마우스 안전성 데이터가 조절 요건을 충족시키기에 충분하지 않은 것으로 간주되는 경우, C57B1/6 마우스에서 추가의 GLP-순응하는 독성학 연구가 수행될 것이다. C57B1/6 마우스는 AAV9.CB7.hCLN2와 연관된 잠재적 독성을 검출하기에 적합한 것으로 간주되는데, 이것은: i) C57B1/6 마우스는 약리학 평가에 사용된 Tpp1mlj 마우스 모델에 대한 배경 균주이고; ii) 마우스에서의 ICV 주사 및 큰 동물에서의 IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내 분포 및 이식유전자 발현 프로파일의 비교가능성이 확립되었고; iii) 건강한 마우스에서 안전성 평가를 수행하는 실행성은 동물 취급 문제 또는 Tpp1mlj 마우스에서와 같이 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 감수성에 의해 제한되지 않으며; 그리고 iv) 건강한 마우스에서 GLP-순응하는 안전성/독성학 연구의 수행은 실현가능하고, 잘-확립되고 통계적으로-강력하다는 것 때문이다.
- [0230] 이 잠재적 GLP 안전성/독성학 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 4-주령 C57B1/6 마우스에서 ICV 주사를 통해 7.5 x 1010, 2 x 1011의 용량 수준 및 7.5 x 1011 GC/g 뇌 질량의 MFD로 투여될 것이고, 마우스는 여러 시점에서 안전성/독성에 대해 평가될 것이다. 예정된 계획된 희생 (주사 후 30 및 90일) 및 연구 기간 (주사 후 90일)은 Tpp1mlj 마우스에서 AAV9 벡터 체내 분포의 동력학 및 질환 표현형의 진행과 일치하도록 선택하였다. 안전성 평가는 임상 관찰, 체중, 임상 병리학, 면역원성, 총 병리학 및 조직의 포괄적인 목록의 조직병리학을 포함할 것이다.
- [0231] 개과 및 쥐과 모델을 포함하여 CLN2 질환의 몇 개의 보고된 동물 모델이 있다. 과학적 문헌에서 가장 잘-특성구명된 것은 Dachshunds의 모집단에서 처음 보고된 TPP1-null 개과 모델이지만 (Awano 등, 2006), 이 동물 모델의 제한된 이용 가능성과 번식 제한은 전임상 시험에서 그것의 사용 가능성을 심하게 제한한다. 과학적 문헌에서 CLN2 질환의 가장 통상적으로 보고된 마우스 모델은 Tpp1tm1Plob 마우스 모델이지만 (Sleat 등, 2004), 이 마우스 모델은 현재 상업적으로-이용가능하지 않고 따라서 전임상 시험에 사용하기에는 실행가능하지 않다. Tpp1tm1Plob 마우스 및 TPP1-null 개과 모델에 아주 유사한 CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델이 상업적으로 입수가능하고 인간에서 CLN2 질환의 특징적인 특징을 재현한다. 이 Tpp1mlj 마우스 모델은 CLN2 유전자의 엑손 8의 스플라이스 공여자 부위 다운스트림에서 단일 뉴클레오타이드 돌연변이로부터 발생한다. 이 돌연변이의 결과로, Tpp1mlj 마우스는 뇌 조직에서 검출불가능한 수준의 TPP1 효소적 활성뿐만 아니라 CLN2 질환을 가진 인간과 유사한 병리생리학, 표현형 및 사망률을 나타낸다 (Karst 등, 2016; 천연 이력 연구로부터 공개되지 않은 데이터).
- [0232] CLN2 질환의 생물학적으로 관련된 마우스 모델 (Tpp1mlj 마우스)에서 수행된 완료된 파일럿 연구는 CLN2 질환의 치료를 위한 코돈-최적화된 CLN2 이식유전자의 AAV9-매개된 전달의 과학적 근거에 대한 예비 지원을 제공한다. 완료된 파일럿 연구에서, 4-주령 Tpp1mlj 마우스에 ICV 주사를 통해 7.5 x 109 GC/g 뇌 질량 (저-용량) 또는 7.5 x 1011 GC/g 뇌 질량 (높은-용량)의 용량 수준으로 AAV9.CB7.hCLN2를 투여하였고, 동물은 주사후 30주 동안 질환 진행 및 생물활성에 대해 모니터링되었다. 고-용량으로 AAV9.CB7.hCLN2 투여된 동물은 야생형 대조군과 비교하여 운동 학습 (소비 기능)의 정규화뿐만 아니라 극적으로 증가된 생존율 (주사후 30주에서 생존율 85% 대 대조군 동물에서 생존율 0%)을 나타냈다. TPP1 효소적 활성 및 조직병리학의 평가를 위해 주사후 30주에서 생존한 모든 동물을 희생시켰다. 고-용량 동물에서, TPP1 활성 (AAV9.CB7.hCLN2에 의해 인코딩된 효소)은 대뇌, 소뇌 및 간에서 과생리적 수준으로 증가하였고, 뇌 뉴런은 별아교세포증 및 기질의 리소좀 축적에서 정정을 나타냈다. 저-용량 (7.5 x 109 GC/g 뇌 질량)으로 AAV9.CB7.hCLN2가 투여된 Tpp1mlj에서는, 저-용량 및 대조군 동물 둘 모두에서 ~17주의 관측된 중앙 생존율로, 생존 또는 다른 생물활성의 측정치에는 이점이 있는 것으로 나타나지 않았다.
- [0233] AAV9.CB7.hCLN2는 파일럿 연구에서 ICV 주사를 통해 Tpp1mlj 마우스에 투여되었으며 (그리고 최종적인 약리학

및 안전성/독성학 연구에 대해 계획되고), 이것은 계획된 임상적 IC 투여의 경로 (ROA)와는 다른 것이다. 그러나, 해부학적 제약 및 동물 복지 문제로 인해 Tpp1m1j 마우스에서 IC 주사는 실행가능하지 않다. IC 투여는 클리닉에서 ICV에 비해 몇 가지 이점을 제공하지만, 다수 동물 연구로부터의 데이터는 마우스에서의 ICV 주사 및 갯과, 돼지, 및 비-인간 영장류 (NHP)에서의 IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 유사한 체내분포 (BD) 및 이식유전자 발현 프로파일을 나타냈다 (Haurigot 등, 2013; Hinderer 등, 2017; McLean 등, 2014; 공개되지 않은 데이터). 따라서, AAV9.CB7.hCLN2의 ICV 주사 후 Tpp1m1j 마우스에서 생성된 약리학 데이터는 표적 환자 모집단에서 임상 시나리오 및 계획된 IC ROA와 관련이 있다.

[0234] 유사한 AAV9 벡터-기반 생성물의 전임상 시험 프로그램의 플랫폼 데이터뿐만 아니라 파일럿 연구로부터 생성된 데이터는 CLN2 질환의 생물학적으로 관련된 쥐와 모델인, Tpp1m1j 마우스에서 계획된 IND-가능 하이브리드 약리학/독성학 연구의 디자인을 알리는 데 사용되었다. 제안된 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 4-주령 마우스에서, 2 x 10¹⁰ GC/g 뇌 질량의 벡터 용량 수준 범위에서 7.5 x 10¹¹ GC/g 뇌 질량의 MFD에서 ICV 주사를 통해 투여될 것이다. 동물은 여러 시점에서 생물활성 및 안전성/독성의 수많은 측정치에 대해 평가될 것이다. 이 연구로부터 생성된 데이터는 안전하고 유효한 개시 임상 용량 수준을 선택하고 표적 환자 모집단에서 AAV9.CB7.hCLN2의 투여의 양호한 이점:리스크 프로파일을 지지하기 위해 사용될 것이다.

[0235] 동물 취급 및 복지 문제로 인해 계획된 하이브리드 약리학/독성학 연구로부터 적절한 안전성 데이터를 획득할 수 없는 경우 (즉, 연속 출혈과 같은 Tpp1m1j 마우스에서 일부 안전성 평가를 수행하기 위한 잠재적인 문제), 데이터는 C57B1/6 마우스에서 GLP-순응하는 안전성/독성학 연구에서 AAV9.CB7.hCLN2의 ICV 투여 후 생성된 추가의 안전성 데이터에 의해 보완될 수 있다. C57B1/6 마우스는 AAV9.CB7.hCLN2와 연관된 잠재적 독성을 검출하기에 적합한 것으로 간주되는데, 이것은: i) C57B1/6 마우스는 약리학 평가에 사용된 Tpp1m1j 마우스 모델에 대한 배경 균주이고; ii) 마우스에서의 ICV 주사 및 큰 동물에서의 IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내 분포 및 이식유전자 발현 프로파일의 비교가능성이 확립되었고; iii) 건강한 마우스에서 안전성 평가 (예를 들어, 연속 출혈)를 수행하는 실행성은 동물 취급 문제 또는 Tpp1m1j 마우스에서와 같이 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 감수성에 의해 제한되지 않으며; 그리고 iv) 건강한 마우스에서 GLP-순응하는 안전성/독성학 연구의 수행은 실행가능하고, 잘-확립되고 통계적으로-강력하다는 것 때문이다.

[0236] 이 잠재적 GLP 안전성/독성학 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 4-주령 C57B1/6 마우스에 ICV 주사를 통해 7.5 x 10¹⁰, 2 x 10¹¹의 용량 수준, 또는 7.5 x 10¹¹ GC/g 뇌 질량의 MFD로 투여될 것이고, 마우스는 여러 시점에서 안전성/독성에 대해 평가될 것이다. 주사 후 30 및 90일에서 예정된 계획된 희생) 및 연구 기간 (주사 후 90일)은 Tpp1m1j 마우스에서 AAV9 벡터 체내 분포의 동력학 및 질환 표현형의 진행과 일치하도록 선택하였다. 안전성 평가는 임상 관찰, 체중, 임상 병리학, 면역원성, 총 병리학 및 조직의 포괄적인 목록의 조직병리학을 포함할 것이다.

[0237] 개념증명 (POC) 및 약리학

[0238] CLN2 질환을 치료하기 위해 CNS에서 TPP1 효소적 활성을 증가시키기 위한 과학적 근거

[0239] CLN2 질환에 대한 치료로서 TPP1 효소적 활성에서의 증가를 목표로 하는 과학적 근거는 CLN2 질환의 치료에서 ERT 및 Brineura®의 투여에 대한 전임상 및 임상 경험에 의해 뒷받침된다 (Katz 등, 2014; Brineura®, 승인 근거의 FDA 요약; Brineura® EPAR; Schulz 등, 2016). 영구적으로 이식된 장치를 통해 Brineura®의 측면 심실 안으로 격주로 주입은 FDA에 의해 CLN2 질환이 있는 환자의 운동 기능을 안정화시키는 것으로 결정되었으며, 반면에 EMA는 언어 기술에도 긍정적인 영향이 있었다고 결정했다. Brineura®의 CSF 및 리소좀 반감기는 각각 7 시간 및 11.5일인 것으로 추정된다; 그 결과, Brineura®의 반복 주입은 상승된 TPP1 효소적 활성 수준 (및 짐작컨대 임상 이득)을 유지하는데 필요하다. 따라서, ERT의 반복 투여와 연관된 높은 환자 부담 및 이환율 없이 CNS에서 내구성 및 장기간 TPP1 효소적 활성을 제공할 수 있는 신규한 요법에 대한 미충족 욕구가 남아있다.

[0240] CLN2 질환을 치료하기 위한 CLN2의 AAV9-매개된 유전자 전달에 대한 과학적 근거

[0241] CNS를 표적화하는 AAV 벡터-기반 생성물의 능력은 수많은 모델의 단일유전자 CNS 질환에서 실증되었고, 제1 세대 AAV 벡터-기반 생성물을 평가하는 몇 개의 초기 인간 시험은 뇌로의 벡터 전달의 안전성을 보여주었다 (Bartus 등, 2014; Janson 등, 2002; Kaplitt 등, 2007; Mandel 등, 2004). 그러나, 이들 제1 세대 AAV 벡터의 낮은 형질도입 효율을 포함하는 많은 인자는 동물 모델에서 관찰된 생물활성의 클리닉으로의 번역을 방지하였다. 제2 세대 AAV 벡터의 출현으로, 뇌로의 유전자 전달의 가능성이 크게 향상되었다. 특히, CNS를 선택적으로 표적화하고 높은 효율로 광범위한 유전자 전달을 달성하는 AAV9 벡터-기반 생성물의 능력이 설치류,

고양이, 개, NHP에서 실증되었다 (Foust 등, 2010; Gray 등, 2013; Hinderer, 2014 등; Hinderer 등, 2014b; Hinderer 등, 2016; Hinderer, 2016b; Haurigot 등, 2013; Bucher 등, 2014; Passini 등, 2014; Hinderer 등, 2017; 도 15). 이 능력은 변이체 CLN6 질환, 척추 근육 위축증 유형 I, 거대 축색돌기 신경병증, MPS I, MPS IIIa, 및 MPS IIIb를 포함한 다양한 징후에 대한 AAV9 벡터-기반 생성물을 평가하기 위한 수많은 임상시험의 개시로 이어졌다.

[0242] CNS에 (가용성 TPP1에 대해 인코딩하는) CLN2 이식유전자의 성공적인 AAV-매개된 전달은 또한 마우스 및 개 질환 모델뿐만 아니라 건강한 랫트 및 NHP에서 수행된 수많은 동물 연구에서 실증되었다 (Hackett 등, 2005; Sondhi 등, 2005; Sondhi 등, 2012). CNS에서 TPP1 효소 활성의 강력하고 지속된 수준을 유도하고, 질환 발병을 지연시키고, 그리고 ICV 주입 및 직접적인 선조체 또는 소뇌 주사 후 생존을 증가시키는 CLN2를 발현하는 AAV2 벡터의 능력은 CLN2 질환의 마우스 및 개와 모델에서 실증되었다 (Haskell 등, 2003; Katz 등, 2015; Katz 등, 2017). 유사하게, CLN2 질환의 마우스 모델 (Tpp1tm1Plob 마우스)에서 수행된 동물 연구는, TPP1 발현 및 효소적 활성에서의 결과적인 증가, 신경행동 기능에서의 개선 및 전체 생존에서의 개선으로, 직접적인 두개내 주사 후 CNS에 CLN2 이식 유전자를 전달하는 AAV5 및 AAVrh10 벡터 둘 모두의 능력을 실증하였다 (Passini 등, 2005; Passini 등, 2006; Sondhi 등, 2007; Sondhi 등, 2008). 이들 효과는 마우스에서 연령-의존적인 것으로 나타났다; 2일령에 AAVrh10 벡터-기반 생성물을 투여한 신생아 CLN2 마우스 (Tpp1tm1Plob 마우스 모델; Sleat 등, 2004)는 3- 및 7-주령에서 생성물을 투여한 마우스와 비교하여 지속적인 TPP1 발현 및 신경행동 기능과 생존에서의 수반되는 개선을 실증하였다 (도 14; Sondhi 등, 2008).

[0243] 이들 유망한 동물 데이터는 CLN2 질환이 있는 환자에서의 다중 임상시험 (ClinicalTrials.gov Identifiers: NCT00151216, NCT01414985, NCT01161576)의 개시를 지지했다. 단계 1 임상시험에서, CLN2를 포함하는 AAV2 벡터-기반 생성물을 CLN2 질환을 가진 10명의 대상체에게 6개 천두공을 통해 직접적인 두개내 주사를 통해 CNS의 12개 위치로 투여하였다. 변형된 함부르크 LINCL 임상 평가 척도에 의한 운동 기능, 발작 활성 및 언어 능력의 평가는 유전자 요법이 12- 및 18-개월 후속조치 둘 모두에서 동반 대조군 대상체와 비교하여 통계적으로 상당히 크게 느린 신경 상태의 감소와 연관이 있었음을 보여주었다 (Worgall 등, 2008; Human Gene Therapy, 2004). 동일한 이식유전자를 전달하는 AAVrh10 벡터-기반 생성물을 평가하는 후속적인 임상시험은 CLN2 이식유전자의 AAVrh10 벡터-매개된 전달이 AAV2, AAV5, 및 AAV 8 벡터-기반 생성물에 비교하여, CLN2 (Tpp1tm1Plob) 마우스에서의 CNS에서 더 큰 벡터 BD를 초래한 동물 연구에서의 관찰에 기초하여 개시되었다 (Sondhi 등, 2007) (이 시험으로부터의 임상 데이터는 이용불가능함). 집합적으로, 이들 전임상 및 임상 경험은 CLN2 질환을 치료하기 위해 CNS로 CLN2 이식유전자의 AAV-매개된 전달의 과학적 근거를 지지한다; 그러나, 이들 AAV2 및 AAVrh10 벡터-기반 접근법은 CNS를 표적으로 하기 위해 일련의 침습성 두개내 주사를 통합하였고 임상 시험에서 질환 진행을 중단시키지 못했다.

[0244] AAV9.CB7.hCLN2는 이들 문제를 다루기 위해 개발되었다. AAV9.CB7.hCLN2에 합체된 AAV9 혈청형은 비-침습성 IC 주사 후 CNS에서 CLN2 이식유전자의 효율적인 형질도입 및 널리 퍼진 체내분포를 가능하게 한다. CLN2 질환이 있는 환자에서, CNS 내의 세포에 TPP1을 인코딩하는 CLN2 이식유전자의 비-침습성 전달은 분비된 TPP1의 영구적 원천을 잠재적으로 제공할 수 있고, 따라서 TPP1 효소적 활성을 회복시키고 CNS 전반에 걸쳐 세포의 장기간 정정을 가능하게 한다. 상이한 양의 TPP1을 발현하는 마우스 CLN2 돌연변이체를 평가한 동물 연구로부터 공개된 데이터에 기초하여, 낮은 수준의 TPP1 효소적 활성조차도 질환 개시를 극적으로 지연시키고 생존을 증가시키기에 충분한 것으로 보인다: 정상 수준의 -0.2%를 발현하는 마우스와 비교하여 뇌에서의 정상 TPP1 활성의 대략 3%가 질환 개시를 지연시키고 ~9개월령의 중앙으로 수명을 배가하였다; 정상 TPP1 활성의 6%의 발현은 영향을 받지 않은 마우스의 수명에 근접한 ~20개월의 중앙 수명으로 질환을 극적으로 약화시켰다 (Sleat 등, 2008). CLN2 질환이 있는 환자로부터의 추가의 임상 데이터는 CLN2에서의 특정 돌연변이는 TPP1 효소적 활성의 불완전한 소실 (적어도 주변 조직에서)과 후속으로 장기 표현형으로 이어질 수 있다는 것을 시사한다 (Sleat 등, 1999; Bessa 등, 2008; Schulz 등, 2013). 따라서, 표적 환자 모집단에서 보통의 수준의 TPP1 효소적 활성조차도 임상적으로 유의미할 수 있다.

[0245] 실시예 9: AAV9의 체내분포/NHP에서 안전성

[0246] IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내분포 (BD)가 유사한 생성물에 대한 전임상 시험 프로그램의 일부로서 주사후 최대 2년 동안 고양이, 개, 및 NHP를 포함한 다수의 종에서 특성규명되었다. 요약하면, 유사한 AAV9 벡터-기반 생성물은 다양한 동물 종에서 낭내 (IC) 주사 후 뇌 및 척수에서 널리 분포되고 지속되었다. 다중 용량 수준이 평가된 경우, 벡터 조직 수준은 거의 용량-의존적이었다. 간 및 비장으로의 벡터 분포는 뇌에서 관찰되는 것보다 일반적으로 높고, 때때로 더 높았다. CNS 및 간 이외의 조직에서의 벡터 농도는 연구 내 및 연구 사

이 둘 모두에서 매우 가변적이지만, 평가된 조직의 다수는 백터를 함유하였다. 전반적으로, 다수의 연구에 걸쳐 수집된 데이터는 CNS (뇌, 척수) 및 주변 (간, 비장)에서 광범위한 분포로, AAV9 백터-기반 생성물에 대해 일관된 BD 프로파일 (동력학 및 표적 조직/기관)을 나타냈다.

- [0247] 유사한 AAV9 백터-기반 생성물 (및 그것의 동물 유사체)의 BD에 대한 이들 기존의 데이터는 본 생성물이 유사하고 바이러스-매개된 백터의 BD가 주로 이식유전자에 독립적인 것으로 여겨지기 때문에 AAV9.CB7.hCLN2에 적용가능하다 (Brandon 등, 2010; Tiesjema 등, 2010; Gonin 등, 2004; Cearley 등, 2006; Zincarelli 등, 2008).
- [0248] 계획된 임상 투여 경로 (ROA)인, 낭내 (IC) 주사 (척수강내 전달 대 대수조 안으로 이미지-유도된 후두엽 천자)의 안전성은 유사한 AAV9 백터-기반 생성물에 대한 전임상 시험 프로그램의 일부로서 수행된 GLP-순응하는 NHP 연구로부터의 안전성 데이터에 기초한다. 간단히, 투여 절차는 모든 동물에서 잘-용인되었다; IC 주사 후 14, 30 또는 90일에서 임의의 동물에서 투여 절차와 관련된 임상, 총 또는 조직학적 발견은 없었다.
- [0249] 계획된 임상시험에서 면역억제의 사용에 대한 과학적 근거는 부분적으로 유사한 AAV9 백터-기반 생성물을 투여한 NHP의 CNS 및 배근 신경절에서의 최소-경증의 축삭병증 및 뉴런 퇴행의 조직병리적 발견에 기초하고, 상기 발견은 임의의 관측된 임상 비정상과는 연관이 없지만 적어도 부분적으로 면역학적으로 매개되는 것으로 보인다.
- [0250] 실시예 10: 임상시험
- [0251] "AAV9.CB7.hCLN2 유전자 요법: 낭내 (IC) 주사를 통한 단일 투여 절차 동안 CLN2 질환이 있는 소아 환자에 대해 후기-유아의 신경 세포이드 지질갈색소증 2형 (CLN2)이 있는 소아 대상체에서 개방 라벨, 다중중심, 순차적인 단일 낭내 용량 단계적 확대 연구로 명명된 FIH 임상시험에서. 상기 시험은 2개 부분으로 구성될 것이다.
- [0252] 시험의 부분 I에서, 안전성과 내성에 일차 초점을 둘 것이고, 최대 2가지 용량 수준이 보존적 용량 단계적 확대 디자인의 일부로 계획된다 - IT ERT (Brineura®)로의 치료 동안 3-5의 기준선 CRS (조합된 운동 및 언어 도메인) 점수를 갖는 ≥ 2 세령인 대상체가, 진행 중인 안전성 위원회 검토로, 최소 8주 간격으로 순차적으로 등록될 것이다. CSF에서 TPP1 효소적 활성의 최저치는 규칙적 IT ERT 주입의 직전에 측정될 것이다. 최저 TPP1 활성 (즉, 이전 ERT 주입으로부터 임의의 잔존 활성)은 Brineura®의 짧은 반감기에 기초한 진행 중인 ERT 치료로부터 검출불가능한/낮은 것으로 기대되고 반면에, 유전자 요법으로부터의 지속된 TPP1 활성은 AAV9.CB7.hCLN2의 주사후 1-4주까지 측정가능한 것으로 기대된다. 일단 최저 TPP1 활성이 측정가능하면 (즉, AAV9.CB7.hCLN2의 투여 후 형질도입된 세포로부터 TPP1의 분비), 내부 안전성 위원회 (ISC)는 특정한 사전-명시된 기준이 충족되면 후속적인 IT ERT 주입을 중단하기로 결정할 수 있다 (예를 들어, 아직 확인되지 않았지만, 안정한 CRS의 적합성, 지속된 TPP1 효소적 활성과 같은 기준이 고려되고 있다). 최소한 대상체는 AAV9.CB7.hCLN2의 주사후 2 및 4주에서 IT ERT를 투여받고 8주차 방문 이전 최대 4주 동안 IT ERT를 중단했다. 2 대상체는 제1 용량 수준으로 투약될 것이다.
- [0253] 연구의 부분 II에서, 외부 독립적인 데이터 모니터링 위원회 (IDMC)는 제1 투약 집단과 동일한 방식으로 더 높은 용량 수준으로 2 대상체에 투약하는 것이 안전한지 여부를 결정할 것이다. 최고-내성 용량 집단은 최대 총 13 추가의 대상체로까지 확장될 수 있으며 IT ERT-치료된 및 IT ERT 순수 대상체 둘 모두의 환자 모집단을 포함할 것이다 (도 6). 봉입/제외 기준은 그렇지 않으면 CLN2 질환 CRS에서 3-5의 점수를 포함하여 이 확장된 모집단에서 동일하게 유지할 것이다. 임상적으로 적절한 IT ERT "구조" 주입을 지시하는 기준은 이전에 IT ERT로 치료받은 환자에 대해 전향적으로 정의될 것이다.
- [0254] 제안된 임상시험에서, CSF에서의 TPP1 효소적 활성 및 반응군으로 분류되는 대상체의 비율을 포함하여 다수의 효능 측정치가 평가될 것이며, 이는: i) CLN2 질환 CRS의 6-포인트 조합된 언어 및 운동 도메인에서 비가역적 (지속된) 2개 카테고리 감소 (즉, 언어 및 운동 도메인의 각각에서 1 또는 운동 도메인 단독에서 2개)가 없고 (Steinfeld 등, 2002); 그리고 ii) "구조" IT ERT 주입이 없는 대상체로서 정의된다. 2 세트의 환자 모집단 (즉, IT ERT 순수 및 IT ERT-처리)이 부분 II 확장 집단에서 계획되며, 여기서 IT ERT 순수 대상체는 72주 동안 추적될 것이고 IT ERT-처리 대상체는 80주 동안 추적될 것이고, 그리고 조합된 두 환자 모집단은 천연 이력 집단에 비교될 것이다. 이들 두 모집단을 조합하는 주된 이유는 일반적으로 CLN2 질환의 회귀성 및 최근 Brineura®의 승인에 따른 IT ERT 순수 환자의 추가의 감소로 인해 시험 등록을 용이하게하기 위한 것이다.
- [0255] IT ERT-치료 환자에서 임의의 잔존 ERT의 잠재적 영향 및 AAV9.CB7.hCLN2의 안전성 및 생물활성의 평가에 대한 잠재적으로 혼란스러운 영향으로 인해, "세정" 기간이 연구 설계에 편입된다. CSF 및 혈장에서 Brineura®에 대한 약동학적 (PK) 데이터는 CSF 및 리소좀 각각에서 대략 7시간 및 11.5일의 반감기를 갖는 명백한 축적 또는

PK 시간-의존성이 없음을 시사하고 (Brineura® EPAR), 따라서, IT ERT의 중단 후 최대 4주의 제안된 "세정" 기간이 적절하다

[0256] 언어 기술과 발달의 평가는 CLN2 질환 진행의 핵심 요소이고 따라서 CRS에 편입된다 (Steinfeld 등, 2002). CRS의 6-포인트 조합된 언어 및 운동 도메인의 언어 도메인의 유용성에 관련한 임의의 문제를 다루기 위해 (Brineura® 마케팅 응용 프로그램의 검토 동안 FDA/CDER에 의해 확인됨 [Brineura®, 승인의 FDA 요약 기준]), 포괄적인 완화 계획이 시행되어 잠재적인 편견을 제거할 것이다.

[0257] FDA는 희귀 질환에 대한 약물 개발을 촉진하고 FDA 산업체용 초안 지침: 심각한 상태에 대한 신속한 프로그램 - 약물 및 생물학 - 2014에서 부족한 유전자의 표적화를 구체적으로 다루기 위해 여러 기회를 제공한다. 이 지침은 또한 "일부 잘 알려진 효소 결핍의 경우, 결핍된 효소의 대체는 임상 이득을 확실하게 예측한다"는 것을 기술하여, 희귀한 유전적 질환에 대한 제품 등록을 지원하기 위해 충분한 수 있는 목적에 관련된 일부 통찰력을 제공한다. 이것은 이식유전자 발현 활성을 안정적으로 입증하는 유전자 요법이 21 CFR 314, 서브파트 H 하에서 가속화된 승인에 대한 표준을 충족할 수 있음을 시사한다. 나아가, 이 주장에 기초하여, 초기 승인 중점에 대한 사례는 결핍된 효소 수준이 알려진 병인과 연관이 있으며 그것의 정정 또는 정상화는 임상적으로 유의미한 효과와 연관이 있는 질환에 대해 이루어 질 수 있다.

[0258] 이전에-승인된 ERT의 환경에서, 효소 수준 (전형적으로 2차 중점)과 임상적으로 유의미한 결과 (선행하는 1차 중점) 사이의 상관관계가 이미 확립되어 있다. CLN2 질환을 포함하는 많은 LSD에서와 같은 이들 사례에서, 기능성 유전자 복제의 성공적인 전달과 이식유전자 산물의 후속적인 발현은 임상 결과에서 관찰된 개선에 훨씬 앞서 (CSF 리소좀 저장 물질 또는 효소 활성에서의 감소의 측정을 통해서와 같이) 초기 시점에서 분명하다. 이것은 유전자 요법 후 효소적 활성이 임상 이득을 위한 대리로서 사용될 수 있음을 시사한다. 제안된 승인을 위한 기준으로 효소 활성의 사용은 또한: "CLN2는 구체적으로 TPP1의 결핍에 기인하고, TPP1의 대체가 내구성이 있거나 질병의 과정에서 초기에 치료가 시작된 경우, 그것의 증후의 역전 또는 예방이 이론적으로 가능하다"는 것을 기술하는 Brineura®에 대한 승인 문서의 요약 기초에 수반한 FDA 디렉터 메모에서 최근에 언급된 바와 같이 FDA 선례와 일치한다. 따라서 TPP1 활성을 중점으로 사용할 가능성은 FDA 지침과 일치한다.

[0259] 제안된 임상시험에서, CLN2 질환 CRS의 6-포인트 조합된 언어 및 운동 도메인에서 안정화 및 CSF에서의 TPP1 효소적 활성의 지속적인 측정을 포함하여 다수의 효능 측정치가 평가될 것이다. 리소좀 저장 물질의 병리적 축적 및 CLN2 질환의 알려진 병인을 예방하는 데 있어서 TPP1 효소적 활성의 확립된 역할에 기초하여, TPP1 활성에서 유의미하고 지속적인 증가는 신경행동 기능에서의 장기간 안정화를 예측할 가능성이 있다. 상이한 양의 TPP1을 발현하는 마우스 CLN2 돌연변이체를 평가한 연구로부터의 데이터에 기초하여, 정상 3-6%의 TPP1 효소적 활성 수준은 질환 발병을 극적으로 지연시키고 생존을 증가시키기에 충분한 것으로 보인다 (Sleat 등, 2008). CLN2 질환이 있는 환자로부터의 추가의 임상 데이터는 CLN2에서의 특정 돌연변이가 TPP1 효소적 활성의 불완전한 소실 (적어도 주변 조직에서) 및 후속으로 장기 표현형으로 이어진다는 것을 시사한다 (Sleat 등, 1999; Bessa 등, 2008; Schulz 등, 2013). 게다가, 영구적으로 이식된 장치를 통해 CSF 안으로 격주로 주입으로 투여된 재조합 TPP1 (Brineura®, 세리포나제 알파, BioMarin Pharmaceuticals)와 함께 ERT는 i) FDA에 의한 96-주 연구 기간에 걸쳐 운동 기능; 및 ii) EMA에 의한 48-주 연구 기간에 걸쳐 운동 및 언어 기능 둘 모두에서의 감소를 안정화시키는 것으로 결정되었다. AAV9.CB7.hCLN2는 CNS에서 TPP1의 효율적이고 지속적인 발현을 위해 설계되었으며, CSF로 AAV9.CB7.hCLN2는 CNS에서 TPP1의 효율적이고 지속된 발현을 위해 설계되었고, CSF 안으로 AAV9.CB7.hCLN2의 1회용 전달은 TPP1 효소의 장기간 원천을 제공하고 높은 미충족 욕구가 있는 이 희귀 유전적 질환에서 질환 진행 및 신경인지력 감퇴를 중단 (또는 상당히 지연)시키는 가능성을 갖는다. 따라서, 임상 데이터가 CRS에서 임상적으로 유의미한 안정화의 장기적 개선을 시사하는 초기 시점에서 CSF에서의 TPP1 효소적 활성에서 상당하고 지속적인 측정치를 나타내는 경우, 미래 마케팅 응용에서 AAV9.CB7.hCLN2의 효능에 대한 일차 지원을 제공하는 이들 데이터의 적절성은 FDA와 논의될 것이다.

[0260] 실시예 11: 완료된 파일럿 연구

[0261] 임상 후보를 선택하고 AAV9.CB7.hCLN2의 생물활성에 대한 예비 데이터를 수집하기 위해, Tpp1mlj 마우스에서 파일럿 용량 범위 연구 (연구 #W2553) (연구 및 파일럿 연구는 IND에서 요약될 것이다)를 포함한 몇 개의 시험관 내 및 생체내 전임상 연구 및 파일럿 연구가 수행되었다. 연구 #W2553에서, 1-개월령 Tpp1mlj 마우스에 총 용적 5 μ l 내에 7.5 x 10⁹ GC/g 뇌 질량 (저-용량; n=10/성) 또는 7.5 x 10¹¹ GC/g 뇌 질량 (높은-용량; n=10/성) 중 어느 하나의 용량 수준으로 ICV 주사를 통해 AAV9.CB7.hCLN2를 투여하였다. 녀아웃 (n=10/성) 및 야생형 대조군 (n=10/성) 동물에는 ICV 주사를 통해 PBS를 투여하였다. 동물은 주사후 30주 동안 질환 진행 및 생존에 대

해 모니터링되었다; 임상 관찰, 체중, 로타로드-계 신경행동 검정 (운동 협응 및 운동 학습), 인간 TPP1 이식유전자 산물에 대한 체액성 면역 반응, 뇌 및 간에서 TPP1 효소적 활성화, 별아교세포증, 지질의 리소좀 축적, 및 생존을 포함한, 안전성 및 생물활성의 예비 측정치가 여러 시점에서 수집되었다.

[0262] 떨림 및 보행 비정상성은 주사 후 대략 8주에 시작하여 연구의 기간 동안 점진적으로 악화되는 Tpp1mlj 대조군 및 저-용량 그룹의 동물에서 매일 임상 관찰시 정성적으로 언급되었다. 처리되지 않은 KO와 저용량 처리된 KO 각각에 대해 환경 자극-유도된 발작이 13 내지 17주령 사이에 가시화되었다. 주사 후 7, 11 및 20주에 생존한 동물에서 신경행동 기능을 평가하기 위해 운동 협응 및 운동 학습의 평가를 수행하였다. 주사후 11주에서 수행된 운동 협응 검정 (낙하 대기 시간을 평가하기 위한 요동 로타로드에서 180초 시험; 10 rpm)에서, 저-용량 및 Tpp1mlj 대조군 그룹에서의 동물은 고-용량 및 야생형 대조군 그룹에서의 동물에 비교해 줄어든 기능을 보이는 것으로 나타났다 (도 18A). 주사후 20주에서 수행된 운동 학습 검정 (3 연속일에 걸쳐 가속하는 로타로드 상에서 300초 시험; 5-40 rpm)에서, 야생형과 고-용량 그룹에서의 생존한 동물 사이에 차이가 있는 것으로 나타나지 않아 (도 18B), 이 파일럿 연구에서 AAV9.CB7.hCLN2의 투여 후 소뇌 기능적 저하의 예방을 시사한다. 다른 시점에서의 신경행동 기능의 평가는 매우 가변적이었다 (데이터 도시되지 않음).

[0263] 이 파일럿 연구로부터의 데이터는 소뇌 기능적 저하의 예방에 대한 AAV9.CB7.hCLN2의 효과를 시사하지만, 이들 신경행동 검정의 유용성은 Tpp1mlj 마우스에서 제한된다. 조기 사망률은 주후 시점에서 Tpp1mlj 대조군 동물의 평가를 방지하고, 임상 관찰 (예를 들어, 확인한 보행 비정상 및 떨림)에 의한 명백한 기능 손상에도 불구하고 데이터는 이들 검정에서 매우 가변적인 것으로 나타났다. 질환 개시에서 조기 사망으로의 신속한 진행뿐만 아니라 동물 취급 중 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 가능성은 추가의 과제를 제기한다.

[0264] 전반적으로, Tpp1mlj 대조군과 저-용량 동물 사이의 생존에서의 차이가 없었고, 반면에 모든 고-용량 동물은 천연 이력 데이터에 기초한 Tpp1mlj 마우스의 기대된 중앙 생존을 넘어서 생존하였다. 주사후 30주에서, 고-용량 그룹에서의 생존율은 85% (수컷 10/10; 암컷 7/10)로 저-용량 및 Tpp1mlj 대조군에서 0%에 대조된다 (도 4A). 조직병리를 위해 주사후 30주에서 생존한 모든 동물은 부검되었다.

[0265] 주사후 30주에서 생존한 모든 동물을 안락사시키고 (즉, 고-용량 및 WT 대조군 그룹 단독; Tpp1mlj 대조군 또는 저-용량 그룹으로부터는 동물이 생존하지 않음), TPP1 효소적 활성화, 염증 (별아교세포증), 및 리소좀 내 기질의 축적의 평가를 위해 조직을 수확하였다. 집합적으로, 데이터는 다음을 포함하여 AAV9.CB7.hCLN2의 생물활성의 추가의 증거를 제공한다: i) 혈청에서 야생형 수준 (데이터 도시되지 않음) 및 대뇌, 소뇌, 및 간에서 과생리적 수준 (도 19 및 20)으로 TPP1 효소적 활성화의 증가; ii) 뇌의 몇몇 부분, 가장 현저하게 해마 (도 21A) 및 피질 (도 21B) (도 21C는 뇌간을 도시함)에서 별아교세포증의 거의 완전한 정정; 및 iii) 3가지 상이한 기술을 통해 나타낸 바와 같이 뉴런에서의 비정상 리소좀 저장 표현형의 정 성적 정정 (데이터 도시되지 않음 뇌간 뉴런 내 리소좀 저장은 3가지 상이한 기술을 사용하여 시각화될 수 있다: 오토-형광, H&E 및 과요오드산-쉬프 (PAS) 염색. 주사후 30주에서 고-용량의 AAV9-hCLN2를 투여한 Tpp1mlj 마우스와 야생형 대조군 마우스로부터의 대표적인 이미지가 수득되었다 (도시되지 않음). 5.5-개월령에서의 Tpp1mlj 대조군 마우스 ('KO'로 표시)로부터의 대표적인 이미지가 수득되었다 (도시되지 않음). 이들 3가지 상이한 기술은 유사한 패턴의 리소좀 축적을 나타낸다. 비정상적인 저장은 Tpp1mlj 대조군 마우스의 뉴런에 축적하고, 고-용량 동물에서 정정된 것으로 보인다. 이들 기술은 단지 정성적인 뿐이지 만, 주사후 30주에서 고-용량 동물의 뇌간의 큰 뉴런에서 리소좀 저장의 감소가 쉽게 검출되었다. 간 및 혈청 둘 모두에서 TPP1 효소적 활성화와 상관관계가 있는 것으로 보이는 세포 형태도입 수준으로, 간으로의 체내분포가 관찰되었다 (데이터 도시되지 않음). 이 파일럿 연구에서 다른 조직은 체내분포에 대해 평가되지 않았다.

[0266] 인간 TPP1 이식유전자 산물에 대한 체액성 면역 반응은 Tpp1mlj 마우스에서 AAV9.CB7.hCLN2의 주사후 3, 10 및 30주에서 ELISA를 사용하여 혈청에서 평가되었다. 비록 인간 TPP1 이식유전자 산물에 대한 고도로 가변성 - 체액성 면역 반응을 나타낸 수준은, 주사후 10주 및 30주 둘 모두에서 고-용량 수컷에서 관측된 최소 반응만으로, 주사후 10주에서 저-용량 수컷에서 최고를 나타냈지만, 데이터는 지속된 면역 반응을 나타냈다; 고-용량 그룹 내에서, 항-TPP1 면역 반응은 또한 주사후 10 및 30주 둘 모두에서 수컷보다 암컷에서 더 높았다. 이들 파일럿 데이터는 AAV9.CB7.hCLN2 체내분포 및 마우스에서의 이식유전자 발현 또는 후속적인 부분적인 내성에서 잠재적인 성별-특이적 차이를 시사할 수 있다. 마우스에서 AAV 벡터-기반 생성물의 간 형질도입 효율이 테스토스테론-의존적일 수 있다는 일부 증거가 있지만 (Davidoff, 2003), 이 파일럿 연구에서 가변성 데이터는 AAV9.CB7.hCLN2의 체내분포 프로파일 또는 면역원성에서의 임의의 성별 특이적-차이보다 동물에서의 인간 단백질에 대한 면역 반응의 평가에 대한 어려움 (및 인간 임상 시나리오에 대한 그것의 해석성 및 적용가능성에서의 어려움)을 더 잘 설명하고 있을 가능성이 있다. 그럼에도 불구하고, 임의의 잠재적인 성별-특이적 차이, 구체적

으로 생물활성 또는 면역원성에 대한 임의의 영향은 계획된 IND-가능 하이브리드 약리학/독성학 연구에서 추가로 평가될 것이다.

[0267] 실시예 12: 뇌심실내 (ICV) 및 소포내 (IC) 투여 경로의 비교

[0268] Tpp1mlj 마우스 모델에서 수행된 파일럿 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 ICV 주사를 통해 투여되었다. 이 투여 경로는 계획된 임상 IC 투여 경로와 다르지만, IC 주사는 Tpp1mlj 마우스에서 실행가능하지 않다. IC 주사 절차 동안, CSF 구획의 압력을 낮추고 대수조에서 바늘 위치가 올바른지 확인하기 위해 작은 용적의 CSF를 빼낼 필요가 있다. 마우스에서 비교적 작은 CSF 용적에 기인하여, CSF를 인출함에 의해 올바른 바늘 배치가 확인될 수 없다. 따라서, 주사 이전에 경막을 노출시키기 위해 근막 및 근육을 절개할 필요가 있다. 이 수술 과정은 시간이 많이 걸리며 마우스에서 수술로 인한 운동 손상 및/또는 병리의 위험을 제공한다.

[0269] IC 주사가 Tpp1mlj 마우스에서 실행가능하지 않다는 것을 고려하여, 큰 동물에서의 IC 주사 및 마우스에서의 ICV 투여 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내분포 및 이식유전자 발현 프로파일의 유사성에 기인하여 약리학/독성학 연구를 위해 ICV 투여 경로가 선택되었다.

[0270] 유사한 AAV9 벡터-기반 생성물에 대한 전임상 시험 프로그램에서, 체내분포 프로파일 (표적 조직/기관)은 마우스에서의 ICV 주사 및 NHP에서의 IC 주사 후에 비교할만한 것으로 나타났다. 유사하게, Haurigot 등, (2013)에 의해 공개된 연구에서, AAV9 벡터 체내분포 및 GFP mRNA 발현은 IC (n= 1) 또는 ICV (n=2) 주사를 통해 2×10^{13} vg/AAV9.GFP 벡터의 동물의 CSF 전달 후 갯과에서 비교되었다. CNS 및 체세포 기관에서의 AAV9 벡터 체내분포 및 이식유전자 발현 프로파일의 병행 분석은 전달 경로 중 어느 하나로의 벡터 형질도입 프로파일에서 주요한 차이를 시사하지는 않았다.

[0271] 따라서, AAV9.CB7.hCLN2의 ICV 주사 후 Tpp1mlj 마우스에서 생성된 약리학/독성학 데이터는 표적 환자 모집단에서의 임상 시나리오 및 계획된 IC 투여 경로에 관련된다.

[0272] 실시예 13: CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델에서 계획된 하이브리드 약리학/독성학 연구

[0273] AAV9.CB7.hCLN2에 대한 제안된 전임상 시험 프로그램은 CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델에서 수행된 IND-가능 하이브리드 약리학/독성학 연구를 포함한다. 일반적으로, 하이브리드 연구 디자인은 표적 환자 모집단의 국소 미세환경 및 병리생리학 상태를 재현하는 질환 환경에서 시험품의 안전성 및 생물활성의 평가를 용이하게 하며, 이는 임상 환경에서 생성물의 안전성 및 생물활성에 영향을 미칠 수 있다. 그 결과, 하이브리드 연구에서 생성된 데이터는 종종 건강한 동물에서 수행된 연구에서 얻은 데이터보다 더 관련성이 있다. 따라서, 제안된 하이브리드 약리학/독성학 연구에서 생성된 데이터는 안전하고 효과적인 초기 임상 용량 수준의 선택을 알려주는 데 도움이 될 것이다.

[0274] 제안된 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 2×10^{10} GC/g 뇌 질량의 용량 수준 범위 내지 7.5×10^{11} GC/g 뇌 질량의 MFD에서 4-주령 마우스에서 ICV 주사를 통해 투여될 것이다. 동물의 절반은 주사후 60일에서 대조군 동물에서의 기대된 신경병리 및 사망률과 일치하도록 희생될 것이며, TPP1 효소적 활성, 리소좀 저장 물질의 축적 및 저장 병리학, 및 별아교세포증을 포함한 생물활성에 대해 평가될 것이다. 동물의 나머지는 질환 표현형 (임상 관찰에 따라 떨림 및/또는 보행 비정상에 의해 정의됨)의 개시까지의 시간에 대해 평가될 것이고, 주사후 최대 210일 동안 장기간 생존이 따르고, 이는 대조군 동물에서 100% 사망률이 기대되는 때를 넘어서는 모든 마우스는 실행 가능한 여러 시점에서 제한된 안전성의 평가를 위해 평가될 것이다.

[0275] 파일럿 연구로부터의 데이터는 Tpp1mlj 마우스에서 소뇌 기능성 감소의 예방에 대한 AAV9.CB7.hCLN2의 효과를 시사하는 반면, 이들 신경행동 검증의 유용성은 제한되었고 장기간 생존에 대한 데이터는 생물활성의 보다 객관적인 척도로 간주된다. 따라서, 파일럿 연구에 사용된 신경행동 검정은 이 연구의 디자인에 편입되지 않았다. 구체적으로, 초기 사망률은 후기 시점에서 Tpp1mlj 대조군 마우스의 평가를 방해하였고, 파일럿 연구로부터의 데이터는 임상 관찰 (예를 들어, 확인한 보행 비정상 및 떨림)에 의해 기능이 분명히 손상됨에도 불구하고 매우 가변적인 것으로 나타났다. 질환 개시에서 초기 사망으로의 신속한 진행뿐만 아니라 동물 취급 중 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 가능성은 Tpp1mlj 마우스에서 이들 평가를 수행하는 데 추가의 과제를 제기한다.

[0276] Tpp1mlj 마우스의 (연속 출혈과 같이 동물 취급을 필요로 하는 생명 안전성 평가를 수행 능력을 제한할 수 있는) 환경 자극-유도된 치명적 갑작 발작에 대한 제한된 조직 이용가능성 및 감수성에 기인해 모든 그룹에서 안전성 및 생물활성의 제안된 모든 측정치를 수집하는 것은 실행가능하지 않다. 따라서, 생물활성의 평가는 그룹 1-6에서 우선순위가 부여될 것이며, 안전성/독성학의 평가는 그룹 7-9에서 우선순위가 부여될 것이다.

- [0277] 제안된 연구를 위한 주요 디자인 요소와 그것의 과학적 근거의 논의는 아래와 같이 제공된다:
- [0278] 1) 질환의 동물 모델: Tpp1mlj 마우스 모델은 CLN2 질환의 생물학적으로-관련된 첫과 모델이다.
- [0279] 2) 시험품: 의도된 임상 생성물 및 제형 (완충액/희석제)가 평가될 것이다.
- [0280] 3) 용량 수준 범위: 2×10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 7.5×10^{11} GC/g 뇌 질량의 범위인 다중 용량 수준을 평가하여 최소 효과적인 용량 (MED) 및 비-관측된-부정적인-효과-수준 (NOAEL)을 확인할 것이다. 파일롯 연구에서, 7.5×10^9 GC/g 뇌 질량의 용량 수준으로 AAV9.CB7.hCLN2가 투여된 Tpp1mlj 마우스에서 생존 또는 다른 생물활성의 측정치에는 이점이 있는 것으로 나타나지 않았다. ICV 투여 경로 (ROA)를 이용하는 Tpp1mlj 마우스에서의 MFD는 7.5×10^{11} GC/g 뇌 질량이다.
- [0281] 4) 뇌심실내 (ICV) 투여 경로 (ROA): 계획된 임상 시나리오에 마우스에서 ICV 경로의 적용가능성을 뒷받침하는, IC와 ICV 경로 간의 유사성의 상세한 설명은 부분 3.4.2.5를 참조하시오. IC 주사 절차의 급성 안전성은 IND #17565 하에서 수행된 NHP 연구에서 이전에 확립되었다.
- [0282] 5) 계획된 희생 및 연구 기간: 주사후 60 및 90일에서 계획된 희생을 각각 Tpp1mlj 마우스 모델에서 질환 표현형의 개시 (질병 개시는 보행 비정상, 떨림, 발작, 및 갑작스러운 사망을 특징으로 함) 및 기대된 신경병리학과 조기 사망률과 일치하도록 선택되었다. 천연 이력 데이터에 기초하여, 임의의 Tpp1mlj 대조군 마우스는 주사 후 210일에 최종 계획된 희생까지 생존할 것으로 기대되지 않는다.
- [0283] 6) 약리학/생물활성 중점: 생물활성을 평가하기 위한 정량적 중점은 하기를 포함할 것이다: 질환 표현형 (임상 관찰시 보행 비정상 및/또는 떨림으로 정의 됨)의 개시 시간, 주사후 60일에서 별아교세포증 정정, 체중 변화 (매주 측정됨), 주사후 60일에서 뇌 조직에서 TPP1 효소적 활성, 및 주사후 210일 동안 생존. 검시 (주사후 60일)에서, 대뇌, 소뇌, 간 및 혈청에서의 리소좀 저장 정정 및 TPP1 효소적 활성의 정성적 조직학은 추가의 생물활성의 측정치를 제공할 것이다. 파일롯 연구로부터의 데이터는 신경행동 측정 (로타로드-기반 분석)이 Tpp1mlj 마우스 모델에서 제한적으로 유용하다는 것을 나타내었다; 따라서, 이들 평가는 이 연구의 디자인에 편입되지 않는다.
- [0284] 7) 안전성/독성 중점: 대조군 마우스 및 최고 용량 수준 (MFD)으로 ICV 주사를 통해 AAV9.CB7.hCLN2가 투여된 Tpp1mlj 마우스는 아래와 같이 다중 시점에서 안전성 및 면역원성에 대해 평가될 것이다:
- [0285] • 임상 관찰 (케이지-측면 이환율 및 사망률 시험, 매일)
- [0286] • 상세한 임상 관찰 (매주)
- [0287] • 체중 (매주)
- [0288] • 완전한 임상 병리학 (d30, d90)
- [0289] • 면역원성 (혈청에서 항-TPP1 항체, ELISA) (기준선, d14, d60, d210)
- [0290] • 장기 중량 (d60, d90)
- [0291] • 거시적 비정상을 나타내는 임의의 조직 및 조직의 포괄적인 목록의 총 병리학 및 조직병리학 (d60, d90)
- [0292] 8) 면역원성 평가: 체액성 면역 반응 (hTPP1에 대한 혈청 항체)은 주사후 기준선 및 14, 60 및 210일에 평가될 것이다. 마우스에서 이식유전자 산물에 대한 체액성 면역 반응은 NHP에서 관찰된 반응과 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다 (데이터 도시되지 않음). 그러나, 세포 면역 반응 (즉, 인터페론 감마 T 세포 ELISPOT 검정)은 검정을 수행하기 위해 전혈로부터 적절한 PBMC를 분리하는 것이 기술적으로 실행가능하지 않기 때문에 마우스에서 정보제공하지 않는다. 이러한 이유로, 마우스에서의 ELISPOT 검정은 비장 세포로 수행될 필요가 있지만, NHP로부터 단리된 비장세포에서 T 세포 반응의 평가를 포함하는 이전의 연구로부터 데이터는 동일한 NHP로부터 PBMC에서 수득된 데이터와 상관관계가 없었다. 따라서, T-세포 면역 반응의 평가는 연구 설계에 편입되지 않는다.
- [0293] 9) 계획되지 않은 사망: 적절하다면, 사망의 원인을 확인하기 위한 시도로 모든 계획되지 않은 사망에 대해 검시 및 다른 평가가 수행될 것이다.
- [0294] 실시예 14: 안전성/독성학 및 체내분포
- [0295] C57B1/6 마우스에서 잠재적 GLP 안전성/독성학 연구

- [0296] AAV9.CB7.hCLN2에 대한 제안된 전임상 시험 프로그램은 CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델에서 수행된 하이브리드 약리학/독성학 연구를 포함한다. 최대 MFD까지 다중 용량 수준에서 ICV 주사를 통해 AAV9.CB7.hCLN2 투여된 마우스는 아래와 같이 다중 수명내 시점 및 계획된 희생에서 안전성에 대해 평가될 것이다:
- [0297] · 임상 관찰 (케이지-측면, 매일)
- [0298] · 체중 (매주)
- [0299] · 임상 병리학 (d60, d90, d210)
- [0300] · 혈청에서 체액성 면역 반응 (혈청에서 항-hTPP1 항체, ELISA) (기준선, d14, d60, d210)
- [0301] · 장기 중량 (d60, d90, d210)
- [0302] · 임의의 생존한 동물 (100% 사망률이 6-개월령까지 대조군 동물에서 기대됨)에 대한 조직의 포괄적인 목록의 총 병리학 및 조직병리학 (d60, d90, d210).
- [0303] 일반적으로, 하이브리드 연구 디자인은, 임상 환경에서 생성물의 안전성 및 생물활성에 영향을 줄 수 있는, 표적 환자 모집단의 국소 미세환경 및 병리생리학 상태를 재현하는 질환 환경에서 시험품의 안전성의 평가를 용이하게 한다. 따라서 제안된 하이브리드 약리학/독성학 연구로부터 생성된 안전성/독성 데이터는 AAV9.CB7.hCLN2의 안전성 프로파일에 관한 중요한 정보를 제공할 것으로 기대된다. 에이전시 안내 권고에 따르면, "생물활성 및 안전성의 평가를 위해 선택된 동물 중은 임상시험 디자인을 안내하는 데이터를 생성하기 위해 인간에서 예상되는 것과 유사한 시험품 [생성물]에 대한 생물학적 반응을 입증해야 한다". 따라서, CLN2 질환의 Tpp1mlj 마우스 모델의 선택은 AAV9.CB7.hCLN2의 안전성의 평가에 적절하다.
- [0304] 질환 Tpp1mlj 마우스에서의 기본 병리학 및 조기 사망률은 잠재적인 시험품-관련된 효과를 숨길 수 있고 일부 안전성 평가 (예컨대 연속 출혈)를 수행하기 위한 능력은 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 Tpp1mlj 마우스의 감수성에 기인하여 제한될 수 있다는 우려를 포함하여 Tpp1mlj 마우스의 안전성을 평가하는 일부 잠재적인 어려움이 있다. 이들 우려가 경험에서 나온 것이고 Tpp1mlj 마우스 안전성 데이터가 조절 요건을 충족시키기에 충분하지 않은 것으로 간주되는 경우, C57B1/6 마우스에서 추가의 GLP-순응하는 독성학 연구가 수행될 것이다. C57B1/6 마우스는 AAV9.CB7.hCLN2와 연관된 잠재적 독성을 검출하기에 적합한 것으로 간주되는데, 이것은: i) C57B1/6 마우스는 약리학 평가에 사용된 Tpp1mlj 마우스 모델에 대한 배경 균주이고; ii) 마우스에서의 ICV 주사 및 큰 동물에서의 IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내분포 및 이식유전자 발현 프로파일의 비교가능성이 확립되었고; iii) 건강한 마우스에서 안전성 평가를 수행하는 실행성은 동물 취급 문제 또는 Tpp1mlj 마우스에서와 같이 환경 자극-유도된 치명적 발작에 대한 감수성에 의해 제한되지 않으며; 그리고 iv) 건강한 마우스에서 GLP-순응하는 안전성/독성학 연구의 수행은 실현가능하고, 잘-확립되고 통계적으로-강력하다는 것 때문이다. 대안적인 종으로 랫트의 선택은 잠재적으로 적절하고 이론적으로 계획된 임상 IC ROA (마우스에서는 실행가능하지 않음)의 도입을 가능하게 할 것이지만, 그러나 이 종은 AAV9.CB7.hCLN2에 대한 전임상 시험 프로그램에서 그것의 사용을 뒷받침하기 위해 충분히 특성규명되지 않았다 (예를 들어, CSF 안으로 전달 후 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내분포 프로파일).
- [0305] 이 잠재적 GLP 안전성/독성학 연구에서, AAV9.CB7.hCLN2는 4-주령 C57B1/6 마우스에서 ICV 주사를 통해 7.5 x 1010, 2 x 1011의 용량 수준 및 7.5 x 1011 GC/g 뇌 질량의 MFD로 투여될 것이고, 마우스는 여러 시점에서 안전성/독성에 대해 평가될 것이다. 예정된 계획된 희생 (주사 후 30 및 90일) 및 연구 기간 (주사 후 90일)은 Tpp1mlj 마우스에서 AAV9 벡터 체내분포의 동력학 및 질환 표현형의 진행과 일치하도록 선택하였다. 안전성 평가는 임상 관찰, 체중, 임상 병리학, 면역원성, 총 병리학 및 조직의 포괄적인 목록의 조직병리학을 포함할 것이다. 제안된 IC ROA의 안전성은 IND #17565 하에서 NHP에서 수행된 연구에서 이전에 확립되었다.
- [0306] 낭내 주사를 통한 AAV9.CB7.hCLN2의 투여의 과학적 근거 및 안전성
- [0307] 낭내 (IC) 주사는 국한된 CSF 구획 내에서 표적 CNS 조직으로 벡터의 직접적인 및 비-침습성 전달을 허용하도록 AAV9.CB7.hCLN2에 대한 투여 경로 (ROA)로 선택되었다 (Hinderer 등, 2014b; Hinderer 등, 2017; IND # 17565). AAV9 벡터-기반 생성물의 정맥내 전달이 또한 CNS 내에서 세포를 표적화하는 것이 밝혀진 반면, CSF 안으로의 전달은 보다 낮은 벡터 용량 수준에서 그리고 주변 기관의 낮은 형질도입으로 뇌에 보다 효율적인 형질도입을 달성하는 것으로 밝혀졌다 (Nathwani 등, 2011; Gray 등, 2013; Hinderer 등, 2014; Hinderer 등, 2014b).
- [0308] 대수조 안으로 이미지-유도된 후두엽 천자를 통한 IC 주사의 최종적인 안전성 평가 (즉, 계획된 임상 ROA)가 유

사한 AAV9 벡터-기반 생성물에 대한 전임상 시험 프로그램의 일부로 수행된 GLP-순응하는 NHP 연구에서 이전에 평가되었다. 간단히, 투여 절차는 다중 연구에 걸쳐 모든 동물에서 잘-용인되었다; IC 주사후 14, 30 또는 90일에서 임의의 동물에서 투여 절차와 관련된 임상, 총 또는 조직학적 발견이 없었다. IND 제출시 완전한 전임상 연구 보고서 (및 이용가능한 임상 데이터)가 제공될 것이다.

[0309] IC 주사 후 AAV9 벡터-기반 생성물에 대한 현존하는 체내분포 데이터

[0310] 표적 환자 모집단에서 IC 주사 후 AAV9.CB7.hCLN2의 가능한 체내분포 프로파일은 유사한 AAV9 벡터-기반 생성물에 대해 생성된 기존의 체내분포 데이터에 의해 알려져 있다. 예를 들어, 유사한 AAV9 벡터-기반 생성물의 체내분포는 IC 주사 후 최대 2년 동안 고양이, 개, 및 NHP를 포함한 다수 종에서 포괄적으로 특성규명되었으며, 체내분포의 최종적인 평가는 FDA/CBER/OTAT (PTS #PS002653 및 PTS #PS002919)의 입력으로 설계된 GLP-순응하는 NHP 연구에서 수행되었다. 요약하면, 이들 생성물은 다양한 동물 종에서 IC 주사 후 뇌 및 척수에 광범위하게 분포되고 지속되는 것으로 나타났다. 다중 용량 수준이 평가된 경우, 벡터 조직 수준은 거의 용량-의존적이었다. 간과 비장으로의 벡터 분포는 일반적으로 뇌에서 관찰되는 것보다 높고 때로는 더 높았다; 제한된 데이터는 AAV9에 대한 기존 역가가 주변 조직 벡터 발현을 감소시킬 수 있지만, CNS 발현에 대한 관찰가능한 효과는 없었다는 것을 시사한다. CNS 및 간 이외의 조직에서의 벡터 농도는 연구 내 및 연구 사이 둘 모두에서 매우 가변적이었지만, 평가된 모든 조직은 벡터를 함유하였다. 게다가, 벡터 발현은 NHP에서 체내분포의 최종적인 평가에서 투여 후 최대 6-개월 동안 의미있게 변하지 않았다.

[0311] 전반적으로, AAV9 벡터-기반 생성물에 대한 체내분포 프로파일 (표적 조직/기관 및 체내분포의 동력학)은 다중 종 및 연구에 걸쳐 일관된 것으로 밝혀졌다.

[0312] 실시예 15: 임상시험

[0313] 임상 개발 프로그램 및 계획된 중요한 임상시험의 개요

[0314] AAV9.CB7.hCLN2에 대한 제안된 임상 개발 프로그램은 2 부분으로 수행된 단일 시험을 포함한다 (도 26; 도 27). 상세한 개요는 부문 4에 제공되어 있다

[0315] 시험의 부분 I에서, 안전성과 내성에 일차 초점을 둘 것이고, 최대 2가지 용량 수준이 보존적 용량 단계적 확대 디자인의 일부로 계획된다 - IT ERT (Brineura®)로의 치료 동안 3-5의 기준선 CRS (조합된 운동 및 언어 도메인) 점수를 갖는 ≥ 2 세령인 대상체가, 진행 중인 ISC 검토로, 최소 8-주 간격으로 순차적으로 등록될 것이다. 2 대상체는 제1 용량 수준에서 투여될 것이고 외부 IDMC는 안전성의 평가 후 더 높은 용량 수준에서 2 대상체를 투약하는 것이 안전한지 여부를 결정할 것이다.

[0316] 연구의 부분 II에서, 최고-내성 용량 집단은 최대 총 15 대상체로까지 확장될 수 있으며 IT ERT-치료된 및 IT ERT 순수 대상체 둘 모두의 환자 모집단을 포함할 것이다. 봉입/제외 기준은 그렇지 않으면 CLN2 질환 CRS에서 3-5의 점수를 포함하여 이 확장된 모집단에서 동일하게 유지할 것이다.

[0317] 시험의 부분 I에서, 비록 효능 파라미터가 측정될 것이지만, 안전성과 내성에 초점을 둘 것이다. 제1 투약 집단에서, IT ERT에 대해 2 자격있는 대상체는 최소로 8주 간격으로 순차적으로 등록되어, 유효한 용량으로 기대된 가장 낮은 용량을 투여받을 것이다. 각각의 대상체는 스크리닝을 받을 것이고 (-35일째 내지 -1일째), 자격있는 경우 1일째에 AAV9.CB7.hCLN2의 단일 IC 용량을 받고 관찰을 위해 투약 후 대략 30 내지 36시간 동안 병원에 남아 있을 것이다. 대상체는 스크리닝 동안 2주마다 그리고 AAV9.CB7.hCLN2의 투여후 최대 8주마다 IT ERT를 계속 투여받을 것이다. CSF TPP1 활성의 최저치는 IT ERT 주입 직전에 측정될 것이다. 최저 TPP1 활성은 유전자 요법으로부터 TPP1 활성이 투여후 1 내지 4주에서 측정가능한 것으로 기대되는 동안 주입으로부터 검출불가능한 것으로 기대된다. 일단 최저 TPP1 활성이 측정가능하고 사전-명시된 기준이 충족될 경우, 그러면 ISC는 특정 사전-명시된 기준이 충족되는 경우 IT ERT의 주입을 중단하는 것으로 결정할 수 있다. 대상체는 AAV9.CB7.hCLN2 후 2 및 4 주에서 IT ERT를 최소로 투여받고 8주째 방문 이전 최대 4주 동안 IT ERT를 끊을 것이다. ISC는 이 대상체에 대해 (8주째 방문 동안 수득된 데이터를 포함하여) 처음 8주 동안 수득된 안전성 데이터를 검토할 것이고, 안전성 문제가 없는 경우, 다음 대상체는 등록될 수 있다. 제2 대상체는 IT ERT를 중단할 시기를 결정하는 동일한 과정을 받아야 한다. 안전성 검토 트리거 (SRT) 관찰되지 않을 경우 (표 35), 두 번째 대상체에 대한 8주째 방문을 포함하여 그때까지 수득된 모든 안전성 데이터가 IDMC에 의해 평가될 것이다. 임의의 사례가 중지 규칙의 기준을 충족하는 경우, 모든 안전성 데이터의 완전한 검토가 수행될 때까지 임의의 신규한 대상체의 투여는 일시중단될 것이다. 임의의 주어진 IDMC 회의에서, 용량 집단의 결론에서 계획되었던 SRT에 의해 요청되든, IDMC는 시험을 중단하거나, 현재 용량으로 추가의 대상체를 투약하거나, 다음 용량 집단으로 진행하거나, 또는

보다 낮은 용량에서 진행하는 것을 추천할 수 있다. 실시간으로, 각각의 투여된 대상체의 안전성과 내성은 아래와 같이 평가될 수 있다:

표 35. 안전성 검토 트리거 및 작용
안전성 검토 유발제 사례
 중지 규칙이 충족됨 (하기 정의됨)

안전성 검토 작용

외부 IDMC는 모든 이용가능한 안전성 데이터를 검토할 것이고 추가의 대상체가 등록할지 여부에 대한 권고를 제공할 것이다.

치료에 대한 관계에 무관하게, 임의의 등급 4 또는 5 유해 사례 (AE)

(주요한 조사자에 의해) 관련된 치료를 고려한 임의의 등급 3 AE

(주요한 조사자에 의해) 치료에 비관련된 것으로 고려한 임의의 등급 3 AE

내부 안전성 위원회는 모든 이용가능한 안전성 데이터를 검토할 것이다. 집단이 등록하는 동안 안전성 우려가 일어나는 경우, 그들은 IDMC에게 그 집단에 대상체를 등록하는 것을 지속할지를 검토할 것을 요청하고 권고할 수 있다.

절차 또는 기기에 대한 변형을 보증할 수 있는 AAV9.CB7.hCLN2 투여 절차에 관한 기술적 문제의 주요한 조사자에 의한 임의의 보고서

- 2 인식가능하게
비정상.
- 1 거의
이해가능.
- 0 난해하거나 또는
언어 없음.

[0318]

[0319]

제2 투약 집단으로 진행하기로 결정한 경우, 부분 I에서 IT ERT에 대한 후속적인 2 자격있는 대상체는 이전의 대상체에 대해 처음 8주 동안 수득된 모든 안전성 데이터 (8주째 방문 동안 수득된 데이터를 포함함)가 검토된 후에 발생하는 각각의 후속적인 환자의 투약으로 초기 용량 집단과 동일한 투약 계획을 따를 것이다. SRT가 관찰되지 않으면, 두 번째 대상체에 대한 8주째 방문을 포함하여 그때까지 얻은 모든 안전성 데이터는 IDMC에 의해 평가될 것이다.

[0320]

IDMC가 시험의 부분 II로 진행하는 것이 안전하다고 판단하면, IT ERT를 받거나 IT ERT에 순수한 대략 13의 추가의 대상체가 경쟁적이고 평행한 방식으로 등록될 것이다. 2년마다 IDMC 회의가 계획되어 있지만, ISC는 언제든지 IDMC 회의를 소집할 것을 결정할 수 있으며, 이것은 또한 등록을 중단하는 것을 포함할 수 있다.

[0321]

현재 IT ERT를 받은 대상체는 적절한 사전-명시된 기준이 충족될 때 (예를 들어, 안정한 CRS, 유전자 요법으로부터 CSF TPP1 활성의 증거, 및 다른 기준들이 고려되고 있음) AAV9.CB7.hCLN2 요법 후 대략 4-6 주에서 ERT를 중단하도록 요청될 것이다. CRS (운동 및 언어 도메인)는 8주마다 또는 변경이 관찰되는 경우 더 자주 측정될 것이다. IT ERT를 다시 시작하기 위한 특이적 지침은 프로토콜 개발에서 예상대로 정의될 것이며 CRS 점수의 변화와 조사자 자신의 임상 평가 및 판단에 기초 할 것이다. 후자와 관련하여, CRS 측정에 근접한 상이한 임상 상황 (예를 들어, 질병, 발작 빈도)은 점수에 영향을 줄 수 있고 질환 진행을 반영하지 않을 수 있다; 따라서, CRS 점수의 가역성을 평가하기 위해 치료 중재 (예를 들어, 발작 약물의 변화) 및 추가의 시험이 수행될 수 있다.

[0322]

IC 공간 안으로 백터의 적용은 이전에 인간에서 수행되지 않았으므로, 이 절차에 대한 위험은 아직 결정되지 않았다. 절차는 임의의 이미지형성 없이 수행되었을 때인 1919년에 원래 설명되었다. 20명의 대상체에서 43개 절차의 일련의 사례는 심각한 합병증을 보고하지 않았으며 본 기술은 주의 깊은 조작자의 손에서 안전해야한다는 결론을 내렸다 (Ayer 등, 1920). 최소 위험 미만을 제시하는 후두엽 천자로부터 잠재적으로 심각한 합병증이 있다. 그러나 본 프로토콜은 이들 위험을 최소화하기 위한 철저한 완화 전략을 제안한다. MRI에 존재하는 의학적 및 수술 이력 또는 해부학적 이상에 근거하여 합병증에 대한 위험이 더 높을 수 있는 환자는 연구에서 배외된다. 게다가, 스크리닝 기간 동안 수득된 MRI 이미지는 참여 센터에서 신경방사선전문의/신경외과의사의 그룹에 의해 검토되며, 위험을 추가로 최소화하기 위해 CT 지침에 따라 수행되는 절차를 진행하기 위해 합의가 요구될 것이다. 계획된 임상 시험에서 이 절차를 수행할 의사에게 훈련 프로그램이 또한 필요하다. 전반적으로, 본 발명자들이 볼 수 있는 위험은 두통 및 주입 부위 반응을 포함하여 요추 천자에서 볼 수 있는 위험과 매우

유사할 것으로 기대된다.

- [0323] 치료적 이식유전자가 장입된 AAV 혈청형의 임상 안전성 및 효능은 지질단백질 리파제 결핍을 나타내는 EMEA-승인 유전자 요법 GLYBERA® (지방족 티파보백; GLYBERA SmPC, 2016)에서 실증되었다. 시각상실 (MacLaren 등, 2014; Maquire 등, 2008), 혈우병 B (Nathwani 등, 2014) 및 기타 여러 질병 적응증 (Luo 등, 2015)의 선천적 형태에 대한 AAV 벡터에 관한 임상시험 경험은 AAV 유전자 요법의 안전성과 잠재적 효능에 대한 추가 지지를 제공한다. AAV9를 포함하여 AAV를 이용하는 몇 개의 진행 중인 유전자 요법 연구가 있다. 그러나, AAV-매개된 유전자 전달의 장기간 위험을 다루는 직접적인 임상 데이터는 제한적이며, 장기간 위험은 알려져 있지 않다.
- [0324] IS 요법은 본 연구에서 시행될 것이며, 코르티코스테로이드 (투여전 1일째에 한번 정맥내로 [IV] 메틸프레드니솔론 10 mg/kg 및 2일째에 0.5 mg/kg/일로 개시하여 점진적으로 줄여주고 12주째에 중단하는 경구 프레드니손), 타크롤리무스 (2-4 ng/mL의 혈중 농도를 목표로 2일째 내지 24주째까지 입 [PO]으로 매일 2회 [BID] 0.5 mg/kg 및 24 내지 32주째 사이의 8주에 걸쳐 테이퍼됨), 및 시롤리무스 (-2일째에 1 mg/m² 매 4시간 x 3 용량의 부하 용량 및 그 다음 - 1일째부터: 48주째까지 1-3 ng/ml의 혈중 농도를 목표로 BID 투약으로 분할된 시롤리무스 0.5 mg/m²/일)를 포함할 것이다.
- [0325] 면역억제는 다른 CNS-지향된 AAV 유전자 요법 연구에 포함되어 AAV 및/또는 이식유전자에 대한 면역반응이 안전성 및 효능 둘 모두에 미치는 영향을 최소화하고 안전하고 잘-용인되는 것으로 보인다. Lysogene (AAVrh.10 벡터-기반 생성물 개발)과 uniQure (AAV5 벡터-기반 생성물 개발)라는 두 회사는 프레드니솔론, MMF 및 칼시뉴린 억제제, 타크롤리무스의 IS 요법을 사용하여 산필립포 증후군 (MPS III)이 있는 환자에서 임상시험을 수행했다. Lysogene는 유전자 요법 후 3년에 걸친 안전성 데이터가 양호한 내성, 주입된 제품과 관련된 유해 사례 (AE)의 부재, 면역억제성 약물과 관련된 독성의 생물학적 징후를 보이지 않았다고 보고했다 (Tardieu 등, 2017). 유사하게, uniQure는 유전자 요법 후 1년에 걸친 조사적인 요법 또는 절차와 관련된 국소 염증 또는 다른 안전성 문제를 보고하지 않았다 (UniQure, 2015).
- [0326] 진행 중인 AAV9-매개된 IT 유전자 전달 연구에서, GAN 유전자에서 적어도 1개의 미스센스 돌연변이를 갖는 GAN 환자는 코르티코스테로이드 만으로 IS를 받았으며, 무효 돌연변이를 가진 1명의 환자는 코르티코스테로이드, 타크롤리무스, 및 시롤리무스로 IS를 받아 적응성 항-이식유전자 반응에 대한 잠재적인 더 높은 위험을 최소화한다 (Bharucha-Goebel 등, 2017). 지금까지, 요법은 임상적으로 잘-용인되는 것으로 보고되었으며, 양 CSF 및 주변 AAV9 NAB 역가 및 CSF 다형성에서 관찰된 상승은 임상 안전성에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다.
- [0327] 제안된 연구에서, IS 레지멘은 사용과 관련된 것으로 간주되며 하기와 같은 이유로 계획되고 있다:
- [0328] · 특히 유전자 산물의 완전한 부재를 초래할 수 있는 유전자 돌연변이가있는 환자에서, TPP1에 대한 잠재적인 과장된 면역 반응을 예방하거나 최소화하기 위함. 그와 같은 면역 반응은 이식유전자를 발현하는 조직에 대한 과민증 반응 또는 면역 매개된 반응의 위험을 증가시킬 수 있다.
- [0329] · AAV9.CB7.hCLN2 및/또는 IT ERT의 생물활성을 잠재적으로 감소시킬 수 있는, TPP1에 대한 Nab의 형성 또는 (기존 Nab가 있을 가능성이 있는 ERT 환자에서) TPP1에 대한 Nab의 증가를 예방하기 위함.
- [0330] 코르티코스테로이드는 AAV 치료 후 초기에 나타날 수 있는 염증의 즉각적인 정도를 감소시키고 따라서 조직손상을 유발할 수 있는 염증 반응의 능력을 최소화할뿐만 아니라 T- 및 B-세포-매개된 적응성 면역 반응을 프라이밍하는 데 신중하다. 타크롤리무스는 칼시뉴린 억제제로서, T-세포 활성화에서의 매우 초기 단계를 차단하여, 손상된 사이토카인 생성 및 T-세포 팽창 및 효과기 세포로의 분화의 차단을 초래한다. 이것은 주로 간과 신장 이식에서 스테로이드와 MMF로 이식후 레지멘의 일부로 일상적으로 사용된다 (Scalea 등, 2016). 타크롤리무스는 이식유전자와 같은 외인성 항원에 대한 T-세포-매개된 면역 반응을 예방하는데 이용가능한 효과적인 약물이다. 이식유전자로의 B-세포 항체 생산을 위해 T-세포 도움이 또한 필요하기 때문에, 이 제제는 세포-매개된 및 체액성 면역 둘 모두를 차단하는데 효과적일 것으로 예상될 수 있다.
- [0331] 라파마이신으로도 알려져 있는 시롤리무스 (RAPAMUNE® USPI, 2017)는 칼시뉴린 억제제의 것과는 다른 기전을 통해 작용한다; 그것은 세포내 신호전달 및 대사 경로를 차단함으로써 T-세포 팽창 및 성숙을 촉진하는 사이토카인의 능력을 억제한다. 그러나, 그것의 순 효과는 많은 동일한 세포 프로세스를 표적화하는 것이다. 또한 이식후 IS에서도 통상적으로 사용된다 (Zhao 등, 2016). 또한, 비임상 및 임상 연구는 시롤리무스가 조절 T 림프구 (Treg)의 상대적인 결핍을 제공할 수 있으며, 이는 반동 면역 반응 없이 약물의 회수를 가능하게 할 수 있다는 것을 시사한다 (Hendrix 등, 2009; Ma 등, 2009; Mingozzi 등, 2007; Singh 등, 2014). 타크롤리무스로 처음 치료하고 그런 다음 면역억제성 효능의 우수한 지속성을 가진 라파마이신으로의 성공적인 "전환"을 갖는 환

자에 대한 유전자 요법 문헌 및 고체 장기 이식 임상시험 둘 모두에서 선행이 있다 (El-Agroud 등, 2017).

- [0332] 다양한 면역억제제에 대한 요법의 기간은 부분적으로 인간 이식에서의 그것의 성공적인 사용 및 MPS III 또는 GAN 유전자 요법 연구에 이용된 디자인에 기초한다. 대상체는 특히 IS가 감소 또는 중단된 시간에 연구 동안 임의의 AE에 대한 실험실 및 임상 시험에 의해 면밀히 모니터링될 것이다.
- [0333] 하기 중점이 제안된다:
- [0334] 안전성 평가:
- [0335] · AAV9.CB7.hCLN2 투약 후 안전성: AE, SAE, 실험실 평가, 활력 징후, ECG, EEG, 물리적 시험, 시력, 발달 이정표, 및 신경 평가
- [0336] · 면역원성 측정
- [0337] · CSF 및 혈장에서 AAV9에 대한 중화 항체 및 TPP1에 대한 결합 항체
- [0338] · 효소-결합 면역점 (ELISPOT) 검정: AAV9 및 TPP1에 대한 T-세포 반응
- [0339] · 바이러스 seeding: CSF, 혈청, 및 소변에서의 백터 농도
- [0340] 효능 평가:
- [0341] · 혈장 및 CSF에서의 TPP1 활성
- [0342] · CRS의 6-점 조합된 언어 및 운동 도메인에서 비가역적 (지속적) 2 카테고리 감소 (즉, 언어 및 운동 도메인 각각에서 1 또는 운동 도메인에서만 2)가 없고 천연 이력 집단과 비교하여 AAV9.CB7.hCLN2 후 IT ERT 순수 대상체의 경우 72주 및 IT ERT-처리된 대상체의 경우 80주를 통해 구조 약물이 없는 대상체의 비율
- [0343] · CRS의 6-점 조합된 언어 및 운동 도메인에서 비가역적 (지속적) 2 카테고리 감소 (즉, 언어 및 운동 도메인 각각에서 1 또는 운동 도메인에서만 2)가 없고 천연 이력 집단과 비교하여 AAV9.CB7.hCLN2 후 96 (IT ERT 순수)/104 (IT ERT-처리) 주를 통해 구조 약물이 없는 대상체의 비율
- [0344] · 천연 이력 집단과 비교하여 AAV9.CB7.hCLN2 후 72 (IT ERT 순수)/80 (IT ERT-처리), 및 96 (IT ERT 순수)/104 (IT ERT-처리) 주를 통한 CRS의 6-점 조합된 언어 및 운동 도메인에서의 평균 감소율 및 기준선으로부터의 변화
- [0345] · 천연 이력 집단과 비교하여 AAV9.CB7.hCLN2 후 72 (IT ERT 순수)/80 (IT ERT-처리), 및 96 (IT ERT 순수)/104 (IT ERT-처리) 주를 통한 CRS의 조합된 및 개별 구성요소 (모터, 언어, 시력, 발작 도메인) 점수에서의 평균 감소율 및 기준선으로부터의 변화
- [0346] · CRS의 6-점 조합된 운동 및 또는 언어 도메인에서 비가역적 2-카테고리 감소에 대한 시간
- [0347] · 지능 지수 (IQ)에 대한 입증된 기기 (지능의 Wechsler 단축된 척도 [WASI-II])
- [0348] · 바이랜드 적응성 행동 스케일로부터의 학부모 보고서, 제2 판 (VABS-II)
- [0349] · MRI에 의한 회백질 및 CSF 심실의 용적측정 분석.
- [0350] · SD-OCT에 의한 망막 두께
- [0351] · QOL 측정: 소아 삶의 질 목록 (PedsQL) 일반적인 코어 스케일 및 CLN-2 특이적 보충물; 영아 유아 삶의 질 설문지™ (ITQOL)
- [0352] 제안된 임상시험에서, CSF에서의 TPP1 효소적 활성 및 하기와 같은 대상체로 정의되는 반응군으로 분류된 대상체의 비율을 포함하여 다수 효능의 측정치가 평가될 것이다: i) CLN2 질환 CRS의 6-점 조합된 언어 및 운동 도메인에서 비가역적 (지속적) 2 카테고리 감소 (즉, 언어 및 운동 도메인 각각에서 1 또는 운동 도메인에서만 2)가 없고 (Steinfeld 등, 2002); 그리고 ii) "구조" IT ERT 주입이 없음. 부분 II 확장 집단에서 두 세트의 환자 모집단 (즉, IT ERT 순수 및 IT ERT-처리)이 계획되며, 여기서 IT ERT 순수 대상체는 72주 동안 추적되고 IT ERT-처리된 대상체는 80주 동안 추적될 것이고, 조합된 두 환자 모집단은 천연 이력 집단과 비교될 것이다. 이들 두 집단을 조합하는 주된 이유는 일반적으로 CLN2 질환의 회귀 성 및 최근 Brineura®의 승인에 따른 IT ERT 순수 환자의 추가 감소에 기인해 시험 등록을 용이하게 하기 위한 것이다. IT ERT-처리된 환자에서 임의의 잔존 ERT의 잠재적 영향 및 AAV9.CB7.hCLN2의 평가에 대한 잠재적으로 혼란한 효과로 인해, "세정" 기간이 연구

설계에 편입되었다. CSF 및 혈장에서 Brineura®에 대한 PK 데이터는 각각 CSF 및 리소좀에서 대략 7 시간 및 11.5일의 반감기가 있는 명백한 축적 또는 PK 시간-의존성을 시사하지 않으며 (Brineura® EPAR), 따라서 IT ERT의 중단 후 최대 4주의 제안된 "세정" 기간이 적절하다. AAV9.CB7.hCLN2 고용량 그룹에서 조합된 IT ERT 순수 및 IT ERT-처리된 대상체를 외부 천연 이력 대조군 그룹에서 가장 가까운 1-1 매칭된 대상체와 비교함으로써 반응군 분석을 사용한 분석이 수행될 것이다. McNemar의 정확 검정은 매칭된 모집단을 분석하기 위해 수행될 것이다. 천연 이력 대조군 그룹으로부터 1-1 매칭된 대상체는 기준선 CLN2 점수, ± 6 개월령, 및 공통 유전자형에 기초하여 선택된다. 1 초과 일치가 발생하면, 다음 순서 (1) 상세한 유전자형 및 (2) 성별에서 추가의 기준선에 일치시킴에 의해 선택은 더 좁혀질 것이다. 이 분석은 IT ERT 순수 대상체의 경우 72주, IT ERT-처리된 대상의 경우 80주에서 수행될 것이다. 기준선 CRS (조합된 운동 및 언어 도메인) 점수는 AAV9.CB7.hCLN2 그룹에 대한 사전 AAV9.CB7.hCLN2 주입일 것이다. 천연 이력 대조군 그룹에서 매칭된 대상체에 대한 72주 동안의 데이터가 분석에 사용될 것이다.

[0353] 미국에서 Brineura®의 승인은 96-주 기간에 걸쳐 CLN2 질환 CRS의 운동 도메인에서 비가역적 (지속적) 2-카테고리 (원시) 감소의 부재 또는 0의 비가역적 점수를 갖는 대상체 비율의 일차 효능 종점에 기초하였다. BioMarin Pharmaceuticals에 의해 본래 제안된 일차 효능 종점은 48주에 걸쳐 운동-언어 총 점수에서 0의 점수 또는 감소의 비가역적 (지속적) 2-포인트 비율 (기울기)의 부재를 갖는 환자의 비율이었다. 기관은 운동-언어 총 점수 사용에 동의하지 않았고 운동 도메인 만 사용하도록 권고했다. 일차 효능 분석 시점은 효능의 실질적인 증거가 48주째 및 72주째에서 발견되지 않은 후에 48주째에서 96주째까지로 변경되었다. 그에 반해서, Brineura®는 EMA에 의해 역사적 천연 이력 데이터와 비교하여 48-주 연구 기간 동안 CLN2 질환 CRS의 조합된 운동 및 언어 도메인에서 2-포인트 감소를 갖지 않는 대상체의 비율에 기초하여 승인되었다. 몇 개의 감수성 및 지지적 분석은 또한 이들 결과를 확인했다.

[0354] 본 기관은 Brineura® 마케팅 응용프로그램 (Brineura®, 승인의 FDA 요약 기준)에서의 상이한 연구에 걸쳐 사용된 CLN2 질환 CRS의 비교가능성에 대한 일부 우려를 제기했다. 임상 결과 평가 검토에서 확인된 첫 번째 주요 문제는 사용된 설명자에서의 잠재적 차이가 특정 점수가, 특히 점수에 대한 '2'의 정성적 설명자의 인용된 예에서, 임상적으로 의미하는 것에 대한 명확한 이해에 도움이 되지 않을 수 있다는 우려였다. 본 기관에 의해 확인된 두 번째 문제는 다음과 같은 둘 모두에 관한 것이었다: i) 상이한 등급의 방법으로, 여기서 천연 이력 연구에서의 대상체는 생후 평가 및 이차 공급원 (예를 들어, 의료 차트, 부모 인터뷰 등)을 통해 후향적 및 전향적으로 둘 모두로 임상적에 의해 평가되는 반면 Brineura® 중심 연구에서의 대상체는 단지 생후 평가를 통해 전향적으로 임상적에 의해 평가되고; 그리고 ii) 상이한 평가의 스케줄로, 여기서 CLN2 CRS 척도는 천연 이력 연구 및 Brineura® 중심 연구에서 각각 대략 12주 및 8주 마다 평가되었다. 본 발명자들은 기관의 검토로부터 천연 이력 연구 및 Brineura® 중심 연구에서 사용된 CLN2 척도에 대한 등급의 불일치가 있었기 때문에 비디오 비교 연구로부터의 발견이 CLN2 운동-언어 총 점수에서 언어 항목의 사용을 지지하지 않았다는 것을 이해한다. 언어 항목과의 더 큰 불일치가 있었다는 것이 관찰되었다.

[0355] 언어 기술 및 발달 평가는 CLN2 질환 환자 모집단에서 중요하고 따라서 AAV9.CB7.hCLN2의 계획된 임상시험에서 CRS에 통합된다. (Brineura® 마케팅 응용프로그램 [Brineura®, 승인의 FDA 요약 기준]의 검토 동안 FDA/CDER에 의해 확인된) 언어 도메인을 포함하는 유용성에 대한 잠재적인 우려를 해결하기 위해, 구체적으로 다음과 같이, 이 도구를 사용하여 잠재적 편견을 제거하기 위한 완화 계획이 시행될 것이다:

[0356] • 천연 이력 연구에 사용된 바와 같은 언어 도메인 등급의 최초 설명적 교과서는 일관된 언어 도메인 등급이 각각의 연구 내에서 그리고 연구간에 운동-언어 총 점수의 해석 및 직접적인 비교를 용이하게 할 수 있도록 하기 위해 사용될 것이다

[0357] • 평가는 다중 독립적인 맹검 심사관에 의한 비디오 평가의 다중 무작위 검토를 통합할 것이고, 여기서 각각의 대상체에 대한 다중 검토 중 하나만 정확한/실시간 순서로 완료된다 (다른 검토는 무작위로 순열된 비디오 평가 순서에 따라 수행된다 (그리고 폐기된다)). 이런 식으로, 종방향 및 개체내 평점은 임의의 잠재적인 편향을 유발함이 없이 동일한 시험관에 의해 수행된다.

[0358] 샘플 크기 계산은 CRS의 6-점 조합된 언어 및 운동 도메인에서 비가역적 (지속적) 2 카테고리 감소 (즉, 언어 및 운동 도메인 각각에서 1 또는 운동 도메인에서만 2)가 없고 천연 이력 집단에 비교하여 AAV9.CB7.hCLN2 후 IT ERT 순수 대상체의 경우 72주 및 IT ERT-처리된 대상체의 경우 80주를 통해 구조 약물이 없는 대상체의 비율에 대한 McNemar의 정확 검정을 사용하여 수행되었다. 제1 집단에서 2 자격있는 대상체에 부가하여, AAV9.CB7.hCLN2 그룹의 고용량에서 총 15 대상체가, 0.05의 양측 유의 수준과 80% 파워로, 천연 이력 대조군 그

롭 및 IT ERT 순수와 IT ERT-처리된 AAV9.CB7.hCLN2 그룹에서 각각 대략 35% 및 95%의 반응 속도를 추정하는, IT ERT 순수 대상체의 경우 72주 및 IT ERT-처리된 대상체의 경우 80주에서의 반응군의 비율에서 대략 60% 차이를 검출하도록 요구될 수 있다. 천연 이력 대조군 그룹에서 72주째에서 35%의 반응 속도는 48주째에서 45%의 반응 속도가 보고된 Brineura® 연구 결과에 기초하여 추정되었다.

[0359] 데이터의 전체성에 기초한 임상 효능의 확립

[0360] FDA는 희귀 질환에 대한 약물 개발을 촉진하는 다중 기회를 제공하고, 구체적으로 FDA 산업체용 초안 지침에서 결핍된 유전자의 표적화를 다룬다:

[0361] 심각한 상태에 대한 신속 프로그램 - 약물 및 생물학 - 2014. 이 안내는 또한, "일부 잘 이해된 효소 결핍의 경우, 결핍된 효소의 대체는 임상 이득을 확실하게 예측한다"는 기술로, 희귀 유전적 질환에 대한 제품의 등록을 지원하기에 충분할 수 있는 목표와 관련된 일부 통찰력을 제공한다. 이것은 이식유전자 발현 활성을 안정적으로 입증하는 유전자 요법이 21 CFR 314, 서브파트 H에 따라 가속화된 승인에 대한 표준을 충족할 수 있음을 시사한다. 나아가, 이 주장에 근거하여, 결핍된 효소 수준이 알려진 병인과 관련이 있으며 그것의 정정 또는 정상화는 임상적으로 의미있는 효과와 연관되는 질환에 대해 조기 승인 목표에 대한 사례로 될 수 있다.

[0362] 이전에-승인된 ERT의 설정에서, 효소 수준 (전형적으로 2차 중점)과 임상적으로 유의미한 결과 (전례의 일차 중점) 사이의 상관관계는 이미 확립되었다. 이들 사례에서, 예컨대 CLN2 질환을 포함한 많은 LSD에서, 기능성 유전자 복제의 성공적인 전달과 이식유전자 산물의 후속적인 발현은 (예를 들어, 예컨대 CSF 리소좀 저장 물질에서의 감소 또는 효소적 활성의 측정을 통해) 임상 결과의 관측된 개선에 훨씬 앞서 초기 시점에서 분명하다. 이것은 유전자 요법 후 효소적 활성이 임상 이득을 위한 대리로서 사용될 수 있음을 시사한다. 제안된 승인의 근거로 효소 활성의 사용은 Brineura®의 승인에서 FDA 감독의 메모에 최근에 언급된 바와 같이, FDA 전례와 또한 일치하며, 이것은 반응 지속기간의 승인가능성에 대해 언급한다: "CLN2는 구체적으로 TPP1의 결핍에 기인하기 때문에, TPP1의 대체가 내구성이 있거나 질환의 과정에서 초기에 치료가 시작되면 TPP1의 징후의 역전 또는 예방이 이론적으로 가능하다". 따라서, 목표로 TPP1 활성을 사용하는 가능성은 FDA 안내와 일치한다.

[0363] 리소좀 저장 물질의 병리적 축적 및 CLN2 질환의 알려진 병인을 예방하는데 있어서 TPP1 효소적 활성의 확립된 역할에 기초하여, TPP1 활성의 유의미하고 지속적인 증가는 신경행동 기능에서의 장기간 안정화를 예측할 가능성이 있다. 상이한 양의 TPP1을 발현하는 마우스 CLN2 돌연변이체를 평가한 연구로부터의 데이터에 기초하여, 정상 3-6%의 TPP1 효소적 활성 수준은 질환 발병을 극적으로 지연시키고 생존을 증가시키기에 충분한 것으로 보인다 (Sleat 등, 2008). CLN2 질환이 있는 환자로부터 추가의 임상 데이터는 CLN2에서 특정 돌연변이가 (적어도 주변 조직에서) TPP1 효소적 활성의 불완전한 소실 및 그에 따른 장기 표현형으로 이어진다는 것을 시사한다 (Sleat 등, 1999; Bessa 등, 2008; Schulz 등, 2013). 게다가, 영구적으로 이식된 장치를 통해 CSF에 격주로 주입으로 투여된 재조합 TPP1 (Brineura®, 세리포나제 알파, BioMarin Pharmaceuticals)을 갖는 ERT는 i) FDA에 의한 96-주 연구 기간 동안 운동 기능; 및 ii) EMA에 의한 48-주 연구 기간 동안 운동과 언어 기능 둘 모두에서 감소를 안정화시키는 것으로 결정되었다. AAV9.CB7.hCLN2는 CNS에서 TPP1의 효율적이고 지속적인 발현을 위해 설계되었으며, CSF로 AAV9.CB7.hCLN2의 1회용 전달은 TPP1 효소의 장기간 공급원을 제공하고, 높은 미충족 욕구가 있는 이 희귀 유전적 질환에서 질환 진행 및 신경인지 감퇴를 중단 (또는 상당히 지연)시킬 가능성이 있다. 따라서, 임상 데이터가 CRS에서 임상적으로 유의미한 안정화에서의 장기적 개선을 시사하는 초기 시점에서 CSF에서 TPP1 효소적 활성의 상당히 높은 지속적인 증가를 나타내는 경우, 미래 마케팅 응용프로그램에서 AAV9.CB7.hCLN2의 효능에 대한 일차 지원을 제공하는 이들 데이터의 적절성은 FDA와 논의될 것이다.

[0364] 실시예 16: 디지털 비바리움을 사용한 바텐 마우스에서 뇌심실내 AAV9.hCLN2co 효능의 평가

[0365] 바텐병의 한 형태인 CLN2 질환은 가용성 효소인, 트리키프티달-펩티다아제-1 (TPP1)을 인코딩하는 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되는 신경퇴행성 리소좀 축적 장애이다. 이 질환은 2-4세에 조기 발병에 의해 특징으로 되며 중간-소아기에 사망 전에 발작과 운동실조증이 나타난다. 재조합 TPP1 (Brineura®, BioMarin Pharmaceuticals)으로의 효소 대체 요법 (ERT)이 최근에 승인되었으며 영구적으로 이식된 장치를 통해 측면 심실 안으로 격주로 주입으로 투여된다. 재조합 효소의 반감기가 짧기 때문에 반복 주입이 필요하다. 따라서, 반복 투여와 연관된 높은 부담 없이 환자에게 지속적인 TPP1 활성을 제공할 수 있는 요법에 대한 상당한 미충족 욕구가 남아있다.

[0366] 이를 해결하기 위해, 본 발명자들은 CLN2 질환인, TPP1^{m1j} 돌연변이체의 마우스 모델에서 인간 TPP1을 코딩하는 뇌심실내 (ICV) AAV9의 효능을 평가하기 위한 연구를 수행하였다. TPP1^{m1j} 마우스는 인간 질환의 대부분의 특징,

예컨대 단축된 수명, 발작, 또는 비정상 보행을 재현한다. 그러나, 이 모델에서 신경행동 기능의 객관적인 모니터링은 이들이 3개월령 후 스트레스-유도된 치명적인 발작을 일으키기 쉽고 이 연령 전에 임의의 측정가능한 결손을 나타내지 않기 때문에 도전적이다. 이를 회피하기 위해, 본 발명자들은 디지털 비바리움 (Vium, Inc.)에서 비편향된 비-침습성 상시 모니터링 시스템을 사용했다. 이 기술은 임의의 오퍼레이터 조작 없이 단일-하우징된 마우스의 집우리에서 연속적 기록을 허용하고 따라서 스트레스와 외부 편향을 제한한다. 7-주령 C57B1/6 TPP1^{m1J} KO 마우스는 우측 뇌 심실에 단일 용량의 3×10^{11} GC의 AAV9-hCLNco를 주입받는다; 비히클-주입된 WT 한배새끼 및 TPP1^{m1J} 마우스는 대조군으로 사용되었다. 치료 2주 후 기록이 개시되었고 희생 또는 예정되지 않은 사망까지 계속되었다. ICV 주사 16주 후인 연구 종결시, 부검을 수행하고 뇌 및 간을 샘플링하였다.

모든 마우스는 하기 파라미터의 연속적 기록을 하면서 Vium 스마트 하우스에 단독-수용되었다:

- 야간 운동
- 매일 운동
- 숨쉬기 속도
- 24시간 주기 리듬

또한, 매주 임상 관찰 및 체중이 문서로 기록되었다. 기록은 AAV9-hCLNco ICV 주사 후 2주 (9주령)에서 시작되어 계획된 희생 (주사 후 16주, 23주령) 또는 계획되지 않은 사망의 경우까지 계속되었다. 빈사 동물의 사망 및 안락사는 연구 전체에 걸쳐 기록되었다. ICV 주사 16주 후인 계획된 연구 종결시에, 남아있는 동물에서 부검을 수행하고, 뇌 및 간 중량을 기록하고, 뇌 및 간에서의 조직병리의 평가를 수행하였다.

처리되지 않은 모든 KO 동물은 떨림, 구부러진 자세, 비정상 보행 또는 발작을 가졌거나, 빈사 또는 사망한 것으로 밝혀졌으며, 반면에 벡터 처리된 KO 동물의 54%는 연구 전반에 걸쳐 현저하지 않았다. 모든 비히클-처리된 KO는 14.9주 초에 시작된 임상 징후를 보고한 반면에 벡터 처리된 KO의 54% (13 중 7)는 연구 전체에서 임상적으로 현저하지 않았다. 최초의 임상적 사건에서 평균 연령은 KO 비히클 처리된 동물에서 16.1주이고, 임상적 사건을 기록한 6 벡터-처리된 KO에서는 18.6주이고; 7 벡터-처리된 KO는 임상적 사건이 없었다. 치료는 모든 동물에서 잘 용인되었고, 간에서 과생리적 TPP1 활성을 생성하고, KO 마우스의 수명을 증가시켰다. 말단 종점 (23주)에서, 처리된 KO의 62% 대 처리되지 않은 KO 마우스의 0%가 생존 하였다 (도 22B). 벡터는 임상 사건의 발생을 지연시키고 감소시켰다 (표 2). 벡터-처리된 마우스의 수명이 상당히 증가되었다 (도 25A 및 25B). 비히클 처리된 동물의 중앙 생존은 KO 수컷에서 17.6주, 및 KO 암컷에서 17.4주였다 (단일-수용된 처리되지 않은 TPP1^{m1J} 마우스의 생존에 대한 성별 효과의 부재) (도 22A). 임상적으로 가시적인 징후의 개시 후 사망은 평균적으로 1.5주에서 발생했다. 말단 희생 종점 (주사 후 16주, 23주령)에서, 처리된 수컷의 57% (7 중 4) 및 처리된 암컷의 67% (6 중 4)가 생존한 반면에 처리되지 않은 모든 KO 마우스는 19주령까지 사망하였다 (도 22A 및 22B). 처리된 KO 마우스 및 비히클 처리된 KO 마우스의 생존 곡선의 비교는 처리된 동물에서 통계적으로 유의미하게 증가된 생존을 보여준다 (Log-rank Mantel-Kox test, $p < 0.0001$).

표 2. 비히클 또는 3×10^{11} GC AAV9.CB7.hTPP1co의 뇌심실내 주사로 처리된 TPP1^{m1J} 및 WT 한배새끼의 임상 사건 (발병률)

임상 사건	KO PBS n=10	KO AAV9 n=13	WT PBS n=13
연구 전반에 걸친 BARH	0%	61.5%	100%
떨림	60%	38.5%	0%
발작	40%	7.7%	0%
빈사	60%	15.4%	0%
발견된 죽음	40%	23.1%	0%
1차 임상 사건	14.9 내지 17.6주	17 내지 >23주	/

PBS: 포스페이트 완충 식염수 (비히클 대조군)

BARH: 밝고, 경계하고, 반응성이고, 그리고 수화됨

또한, AAV9.CB7.hTPP1co 벡터는 질환-관련된 체중 감소를 방지하였다 (도 23A 및 23B). 치료는 2상 생물학적 주기 운동 프로파일 (데이터 도시되지 않음) 및 매주 평균 야간 운동 (도 24)을 보존하였다. WT 및 처리된 KO 동

물 둘 모두는 명확한 2상 생물학적 주기 운동 프로파일을 나타내었고, 반면에 비히클 처리된 마우스는 약 16주령에 2상 프로파일을 잃기 시작했다. 스마트 케이지를 이용한 운동의 연속적 기록은 14.7주령 이후로부터 비히클 처리된 TPP1mIJ 마우스, 그렇지 않은 경우 무증상 마우스에서 신경행동 손상의 검출을 허용하였다 (도 24). 모든 그룹에서 숨쉬기 속도는 비슷했다 (도시되지 않음).

[0376] 디지털 비바리움에 의해 허용된 반복된 측정을 이용하여, 선형 혼합된 효과 모델링을 사용한 야간 운동 속도의 통계적인 분석은 14.7주령에 시작한 벡터-처리된 KO 마우스에서 상당한 치료적 이점을 나타냈고 반면에 제1 임상 사건에서의 평균 연령은 16.1주였다. 이것은 KO 마우스가 심하게 가시적인 임상 징후의 개시에 앞서 신경행동 손상을 가지고 있으며 치료가 이러한 손상을 구조했음을 입증한다. 신경행동 파라미터의 구조에 상응하여, 신경염증의 마커인, 별아교세포증 (도 25A 및 25B)은 벡터처리된 동물에서 감소되었다.

[0377] 전적으로, 이들 결과는 신경행동 징후를 예방하고, 생존을 증가시키고, 삶의 질을 유지하고, CLN2 질환과 관련된 신경염증을 구제하는 AAV9-매개된 유전자 요법의 치료적 효능을 입증한다. 최신 디지털 비바리움을 사용하여, 본 발명자들은 또한 이 모델에서 객관적인 초기 효능 판독을 제공하는 사전증상 마우스에서 24시간 주기 리듬 비정상 존재를 실증했다. 이 파일럿 연구는 뇌척수액에서 AAV9의 단일 투여가 CLN2 질환의 치료를 위해 ERT를 반복하는 대안이 될 수 있다는 것을 시사한다.

[0378] 본 명세서에 인용된 모든 공개된 문서는 2018년 4월 3일자로 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/652,006, 2017년 12월 18일자로 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/599,816 및 2017년 5월 11일자로 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/504,817과 같이 본 명세서에 참고로 편입된다. 유사하게, 본 명세서에 언급되고 부가된 서열목록에 나타나는 서열번호는 참고로 편입된다. 본 발명은 특정 구현예와 관련하여 기재되었지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않고 변형이 이루어질 수 있음이 인정될 것이다. 그와 같은 변형은 첨부된 청구항들의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0379] (서열목록 프리 텍스트)

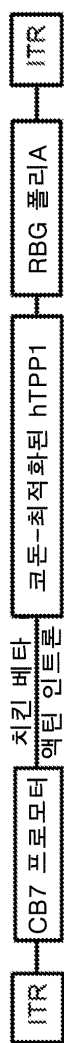
[0380] 하기 정보는 숫자 식별자 <223> 하에서 프리 텍스트를 함유하는 서열에 대해 제공된다.

서열번호: (프리 텍스트 함유)	<223> 하에서 프리 텍스트
3	<223> 삭제된 서열
5	<223> 삭제된 서열
6	<213> 아데노-연관된 바이러스 9
7	<213> 아데노-연관된 바이러스 9
8	<223> 삭제된 서열

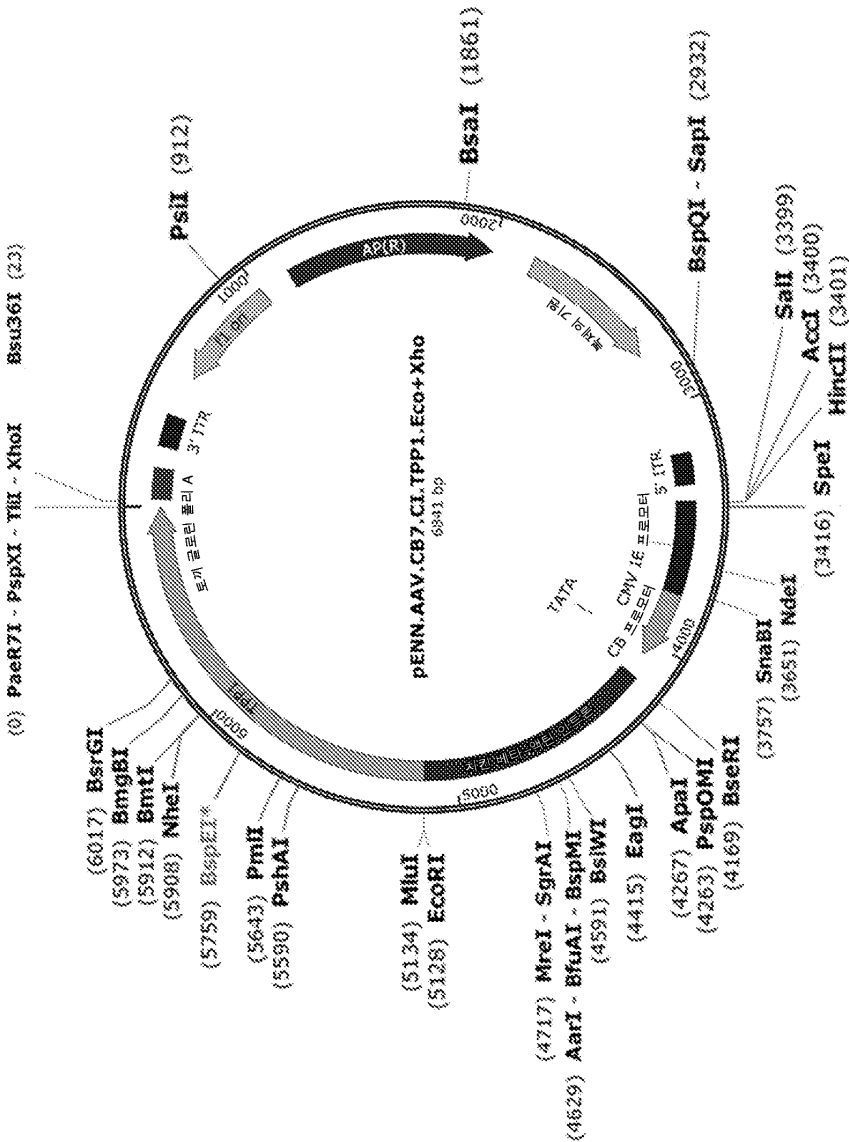
[0381]

도면

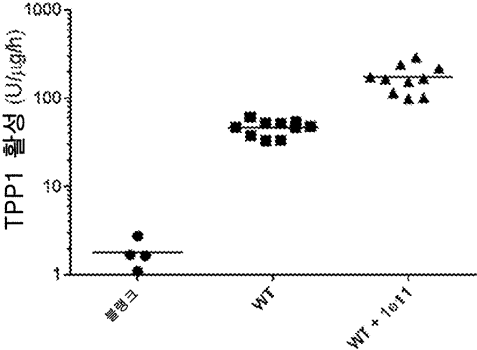
도면1a



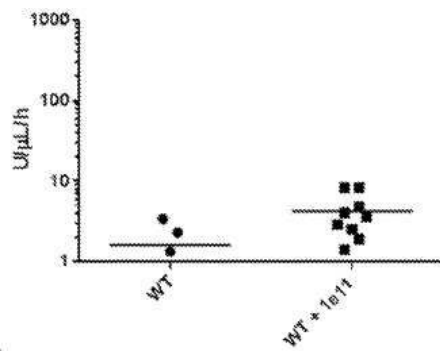
도면1b



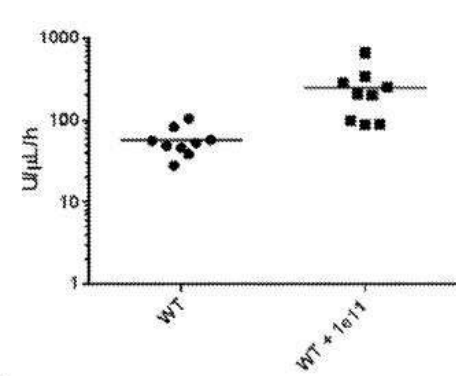
도면3a



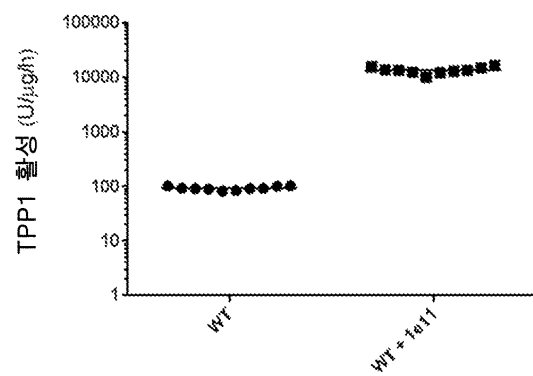
도면3b



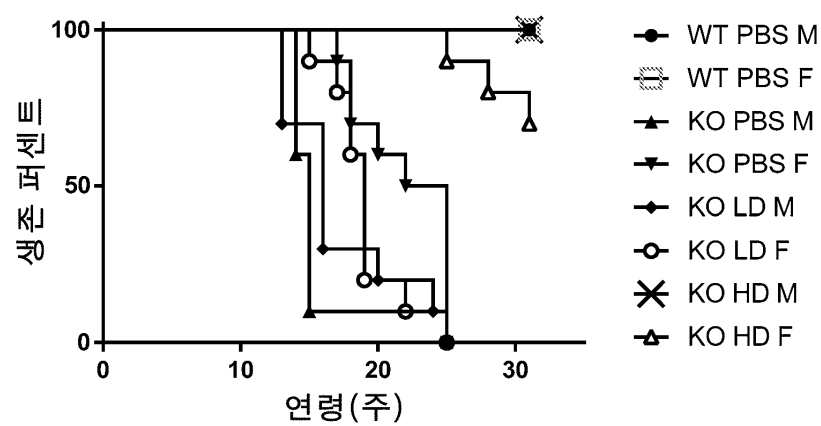
도면3c



도면3d



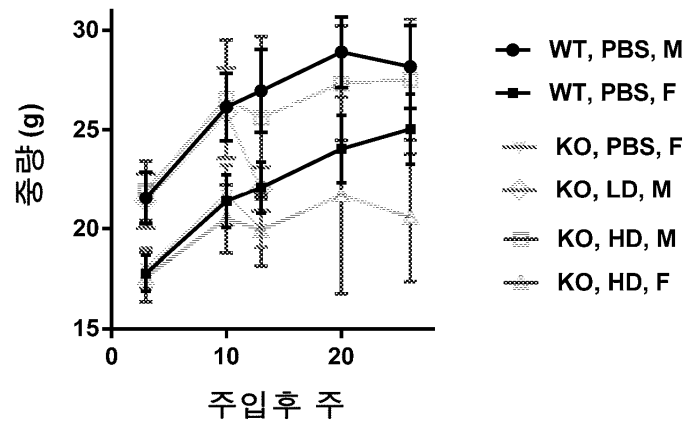
도면4a



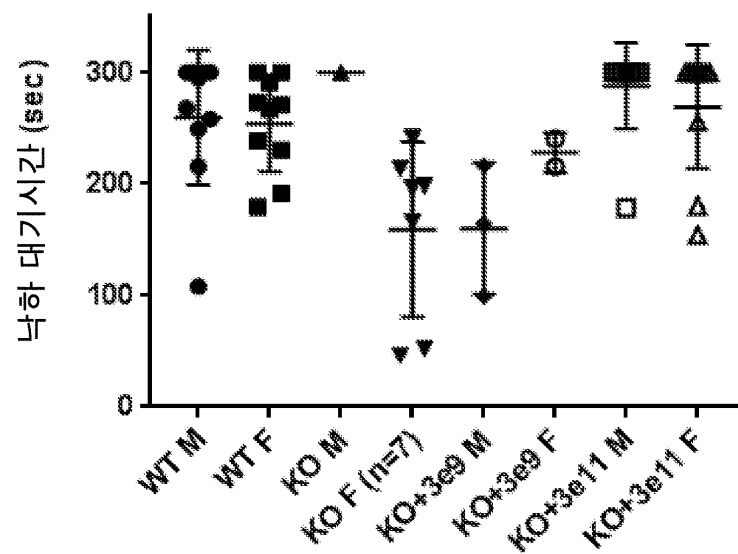
도면4b

	WT M	WT F	KO M	KO F	KO+3e9 M	KO+3e9 F	KO+3e11 M	KO+3e11 F
중앙 생존 (w.)	비정의됨	비정의됨	15	24	16	19	비정의됨	비정의됨

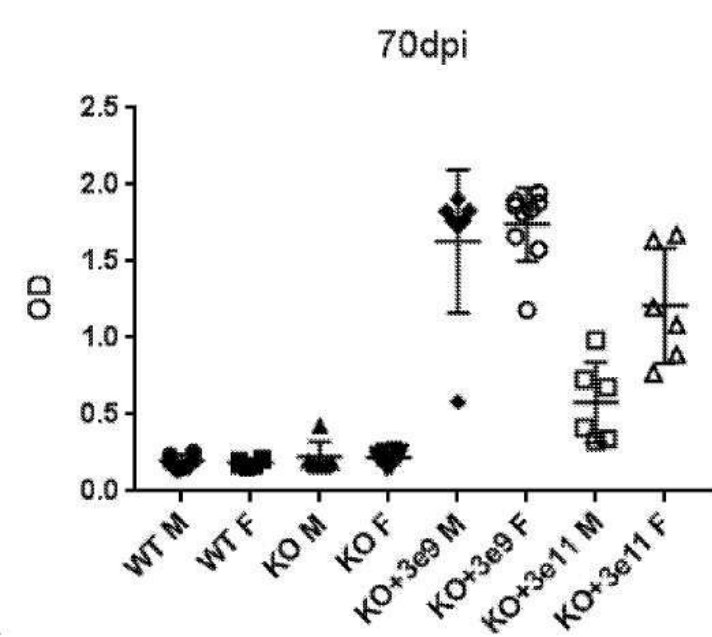
도면5



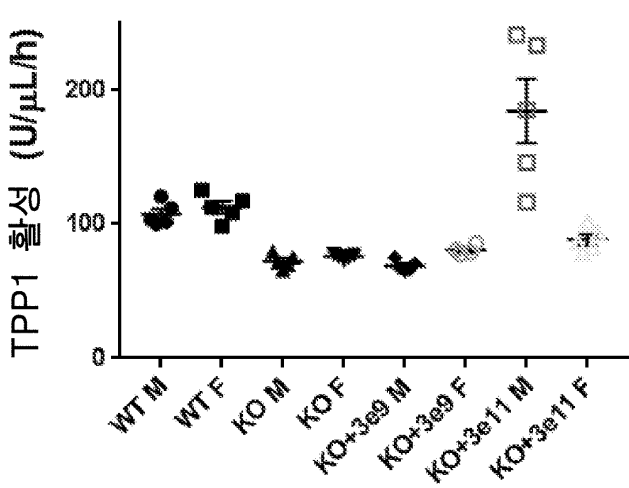
도면6



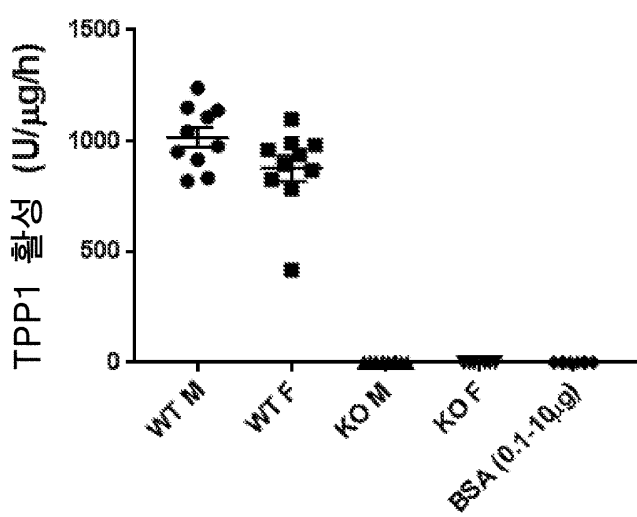
도면7a



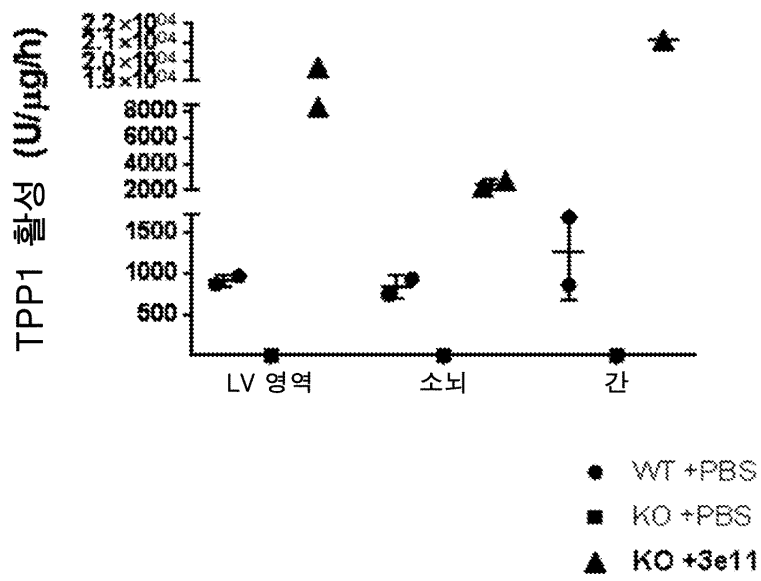
도면7b



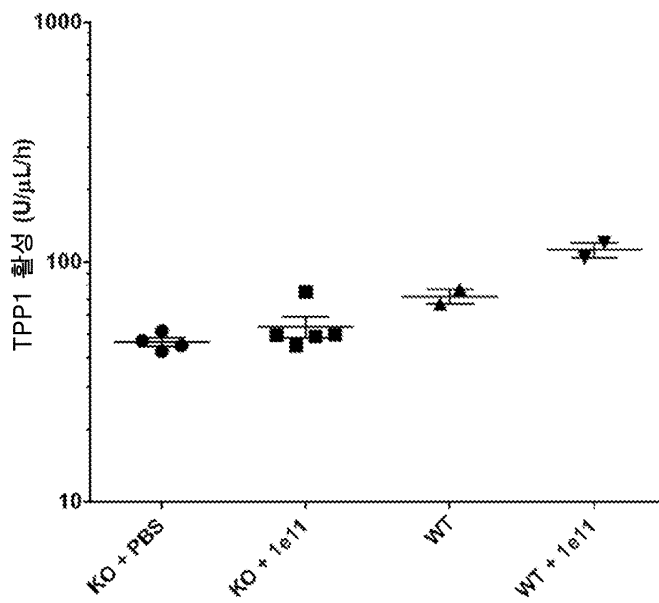
도면8a



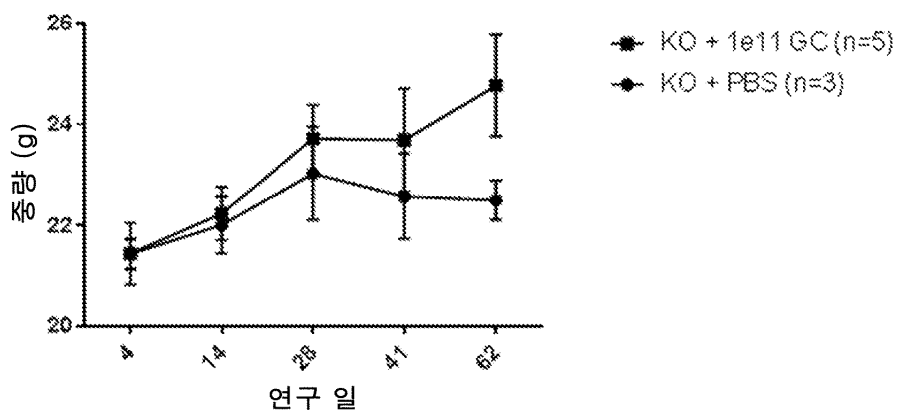
도면9



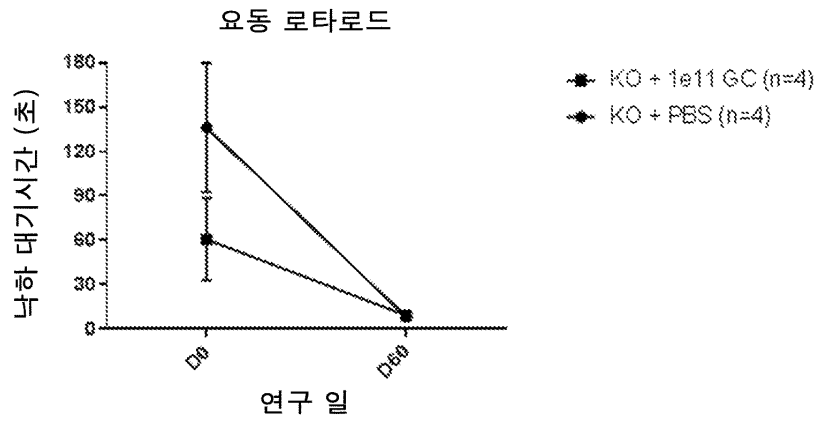
도면10



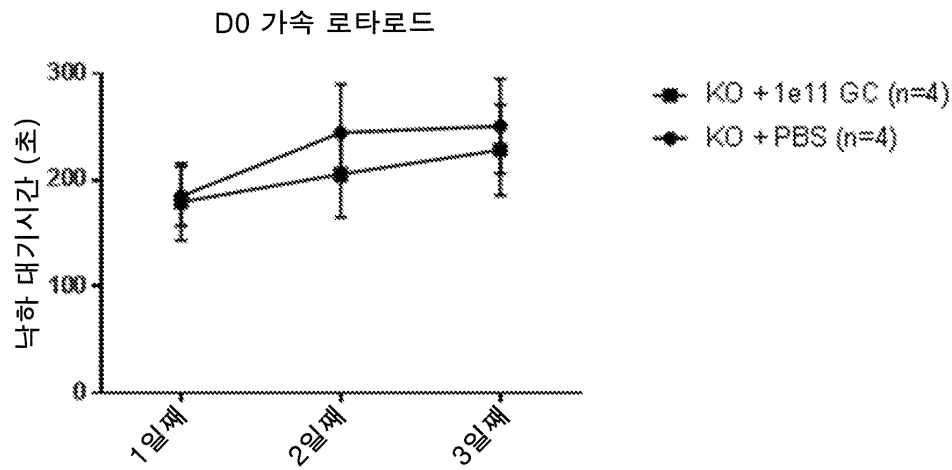
도면11



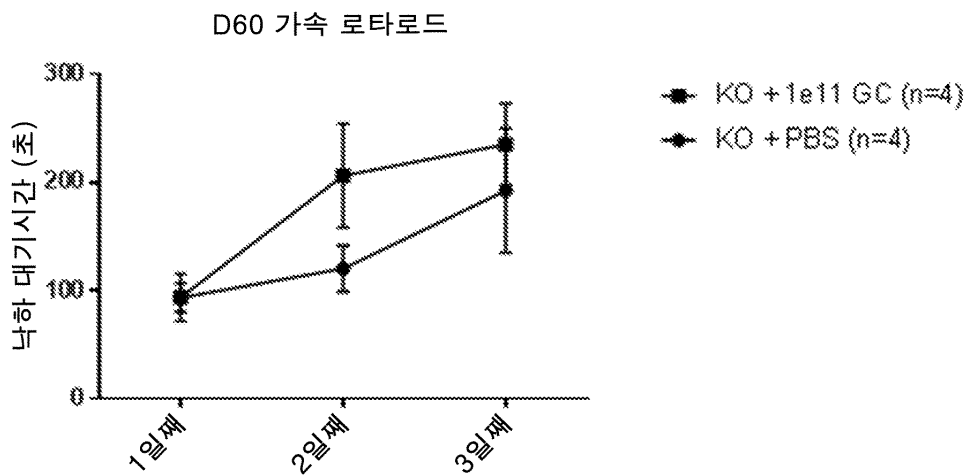
도면12a



도면12b



도면12c



도면13a

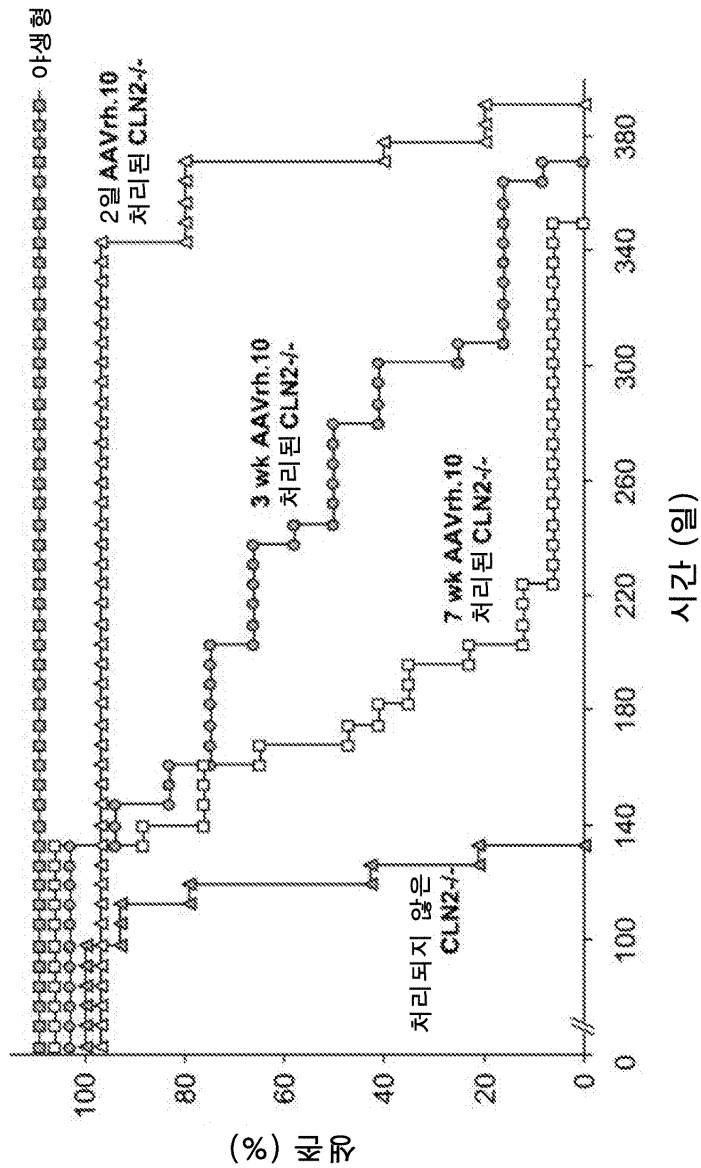
CLUSTAL O(1.2.4) 다중 서열 정렬 78.56% 동일성

TPP1_순수	atgggactccaagcctgcctcctagggctctttgccctcatcctctctggcaaatgcagt	60
TPP1_co	atgggactgcaggcctgtctgtctgggactgttcgccctgatcctgagcggcaagtgcagc	60
	***** ** *	
TPP1_순수	tacagcccgagagccgaccagcggagcgtgccccaggctgggtgtccctgggccgt	120
TPP1_co	tacagcccgagagccgaccagagaagaacactgcctccaggctgggtgtccctgggcaga	120
	***** *	
TPP1_순수	gcggaaccttgaggaaagagctgagctctcacctttgccttgagacagcagaatgtggaaga	180
TPP1_co	gctgacctgaagaggaaactgagcctgaccttcgccctgaggcagcagaactgtggaaga	180
	** *	
TPP1_순수	ctctcggagctgggtgcaggctgtgtcggatccagctctcctcaatacggaaaatacctg	240
TPP1_co	ctgagcgagctgggtgcaggcgtgtccgatccatagcagcctcagtagcggcaagtacctg	240
	** *	
TPP1_순수	accctagagaatgtggctgatctgggtgagggcactcccaactgacctccacacgggtgcaa	300
TPP1_co	acctgggaaaacgtggcgcacctgctgaggcctagcctctgacactgcacacgctgacag	300
	***** ** *	
TPP1_순수	aaatggctcttggcagccggagcccagaagtgccattctgtgatcacacaggactttctg	360
TPP1_co	aagtggctgctggctgcggcgtcagaaatgccactcgtgatcaccaggactttctg	360
	** *	
TPP1_순수	acttgcgtgctgagcatccgacaagcagagctgctgctccctgggctgagtttcatcac	420
TPP1_co	acctgttgctgagcatccggcaggccgaactgctgctgctgggcccaggtttcatcac	420
	** *	
TPP1_순수	tatgtgggagacctaaggaaacccatgttgtaagggtcccaatccctaccagcttcca	480
TPP1_co	tatgtgggagacccaagcagacacatgtcgtgagcagccacacccctaccagctgcca	480
	***** *	
TPP1_순수	caggccttgccccccatgtggactttgtgggggactgcacgcttttcccccaacatca	540
TPP1_co	caggctctggccccctacgtggactttgtggaggcctgcacagattcccccaacagc	540
	**** *	
TPP1_순수	tccttgaggcaacgtctctgagcgcaggtgacagggactgtaggcctgcatctgggggtg	600
TPP1_co	agcctgagacagaggcctgagccacaagtgcaggcagcagtgaggcctgcatctgggctg	600
	***** ** *	
TPP1_순수	acccctctgtgatccgtaagcgatacaacttgacctcacaagacgtgggctctggcacc	660
TPP1_co	acacctaagctgatccggaagcggatcaacctgaccagccaggtatgtgggcagcggcacc	660
	** ** *	
TPP1_순수	agcaataacagccaagcctgtgcccagttcctggagcagtagtttccatgactcagacctg	720
TPP1_co	agcaacaatagccaggcctgcccagttcctggaaacagtagtttccacgacagcgatctg	720
	***** ** *	
TPP1_순수	gctcagttcatgcgcctcttcggtggcaactttgcacatcaggcatcagtagcccggtgtg	780
TPP1_co	gccagattcatgcggctgttcggcggcaacttcgcacatcaggctagcgtggccagagtc	780
	** *	
TPP1_순수	gttggaacaacagggccggggccgggaggtgaggccagctctagatgtgcagtagcctg	840
TPP1_co	gtggggcagcaggggaagaggcagagccggaattgaggcctccctggacgtgcagtagcctg	840
	** ** *	
TPP1_순수	atgagtgtgtgtgccaacatctccacctgggtctacagtagccctggccggcatgaggga	900
TPP1_co	atgagcgtgtggcccaacatcagcacctgggtgtacagcagcccgagacacgagggc	900
	***** *	
TPP1_순수	caggagcccttctcagtggtgctgctcagtaatgagtcagccctgccacatgtg	960
TPP1_co	caggaaaccttttctcagtggtgctgctgagcgaacgagagcgcctgcctcatgtg	960
	***** ** *	

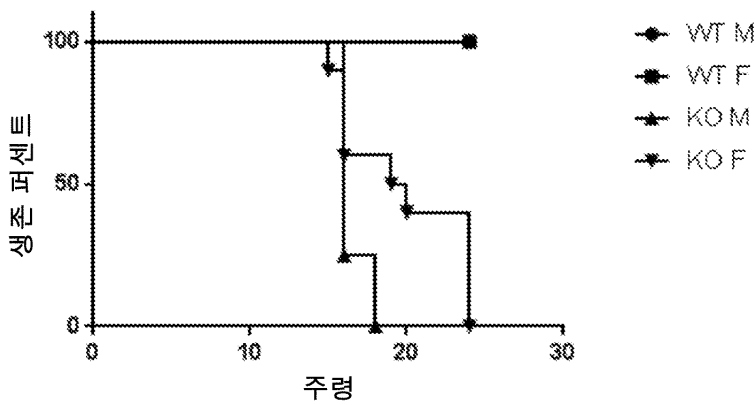
도면13b

TPP1_순수	catactgtgagctatggagatgatgaggactccctcagcagcgccacatccagcgggtc	1020
TPP1_co	cacacagtgtcctacggcgacgacgaggacagcctgagcagcgccacatccagagagtg ** ** *	1020
TPP1_순수	aacactgagctcatgaaggctgccgtcgggggtctcaccctgctcttcgcctcaggtgac	1080
TPP1_co	aacaccgagctgatgaaggccgctgccaggggactgaccctgctgtttgcctctggcgat *	1080
TPP1_순수	agtggggccgggtgttggtctgtctctggaagacaccagttccgcctaccttccctgcc	1140
TPP1_co	agcggagccggtgttggtgagtggtcaggccggcaccagttcagaccaccttccctgcc *	1140
TPP1_순수	tccagcccttatgtcaccacagtgaggcagcatccttccaggaaccttccctcatcaca	1200
TPP1_co	agctccctcactgtagacaaccgtggcgccgacccctccttccaggaaccttccctgatcacc *	1200
TPP1_순수	aatgaaattgttgactatatcagtggtggtggcttcagcaatgtgttccacggccttca	1260
TPP1_co	aacgagatcgtggactacatcagcgcgagggttcagcaactgtgttccacagaccagc *	1260
TPP1_순수	taccaggaggaagctgtaacgaagttcctgagctctagccccccacctgccaccatccagt	1320
TPP1_co	taccaggaagaggccgtgaccaagtctcctgtcctccagccctcatctgccccccagctcc *	1320
TPP1_순수	tacttcaatgccagtgccgtgcctaccagatgtggctgcactttctgatggctactgg	1380
TPP1_co	tacttcaacgccagcgccgagagcctaccagatgtggccgctctgtccgacggctactgg *	1380
TPP1_순수	gtggtcagcaacagagtgcccattccatgggtgtccggaacctcgccctctactccagtg	1440
TPP1_co	gtgggtgtccaaacagagtgccatcccttgggtgtccggcacaagcgccagcaccctgtg *	1440
TPP1_순수	tttggggggtatcctatccttgatcaatgagcacaggatccttagtgccgccccctctt	1500
TPP1_co	tttggcggtatcctgtccctgatcaacgagcacagaatcctgtccggcagacccccctg *	1500
TPP1_순수	ggctttctcaacccaaggctctaccagcagcatggggcaggactctttgatgtaaccgt	1560
TPP1_co	ggcttctctgaaccctagactgtaccagcagcagggcgtggcctgttcgatgtgaccaga *	1560
TPP1_순수	ggctgccatgagtcctgtctggatgaagagtagaggccagggtttctgctctggctct	1620
TPP1_co	ggctgccacagagagctgctggacaggaagtgaaggccagggttctgttctggccct *	1620
TPP1_순수	ggctgggatcctgtaacaggctgggggaacacccaacttcccagctttgctgaagactcta	1680
TPP1_co	ggctgggatcctgtgacggatggggcacccttaacttcccgcctgtgtaaaacactg *	1680
TPP1_순수	ctcaaccctgac	1693
TPP1_co	ctgaaccctgat * * * * * * * * *	1693

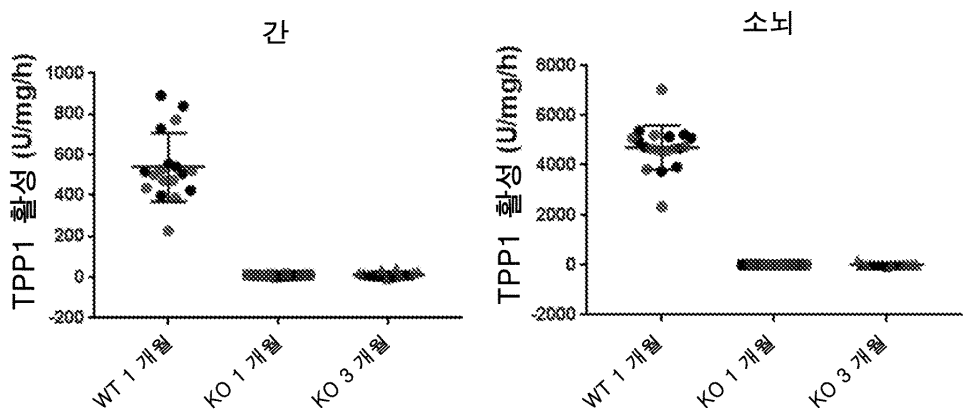
도면14



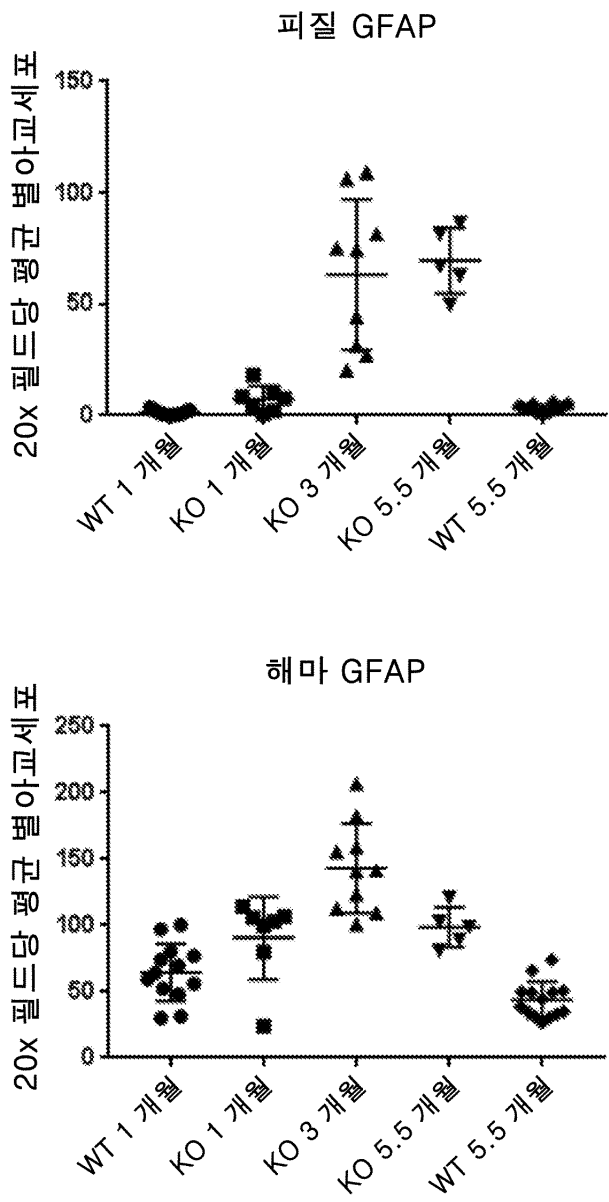
도면15



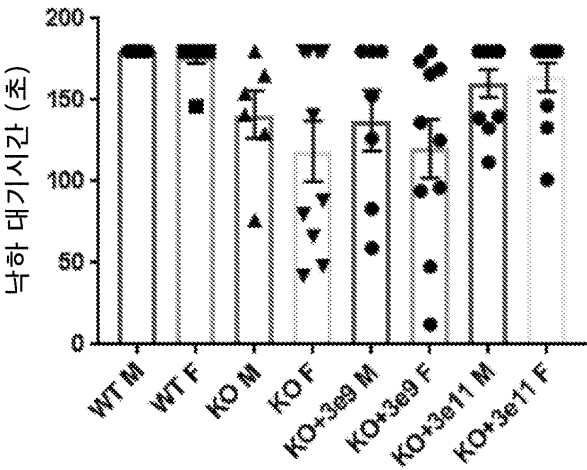
도면16



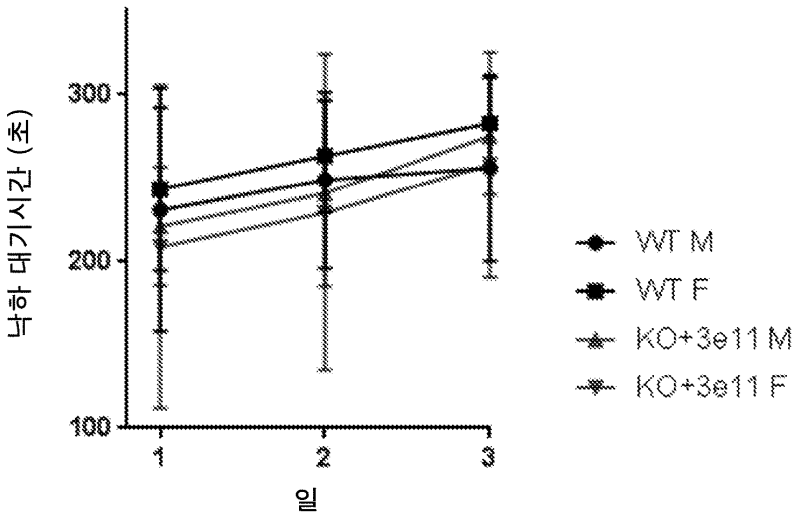
도면17



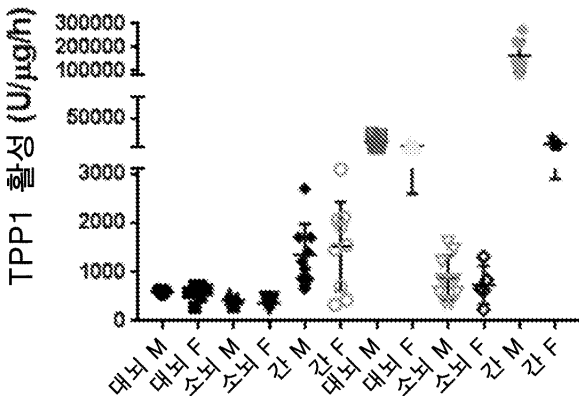
도면18a



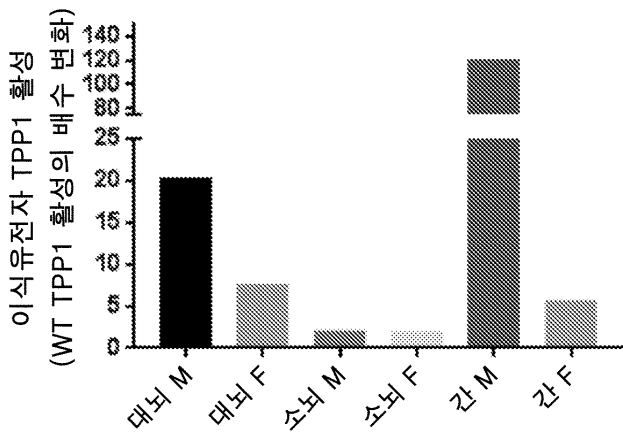
도면18b



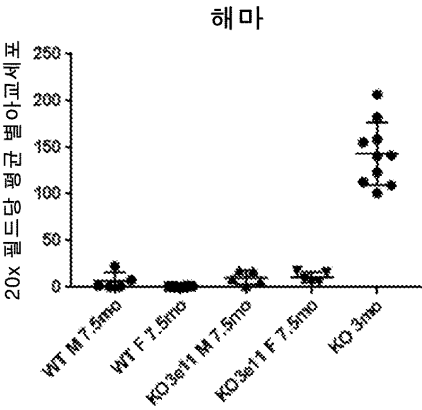
도면19



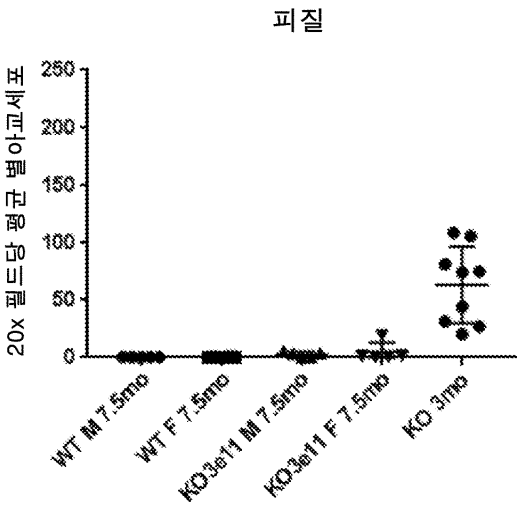
도면20



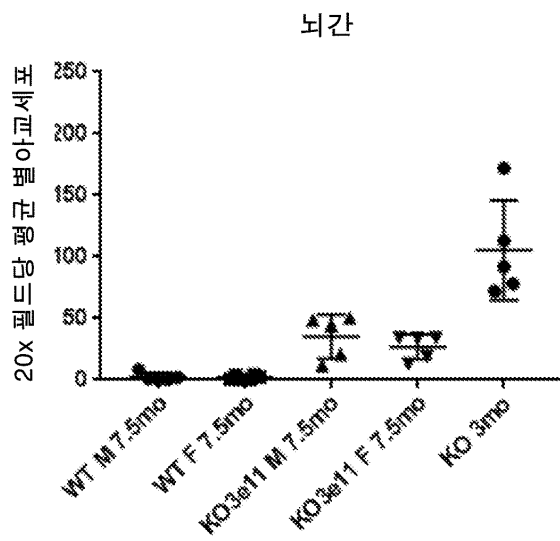
도면21a



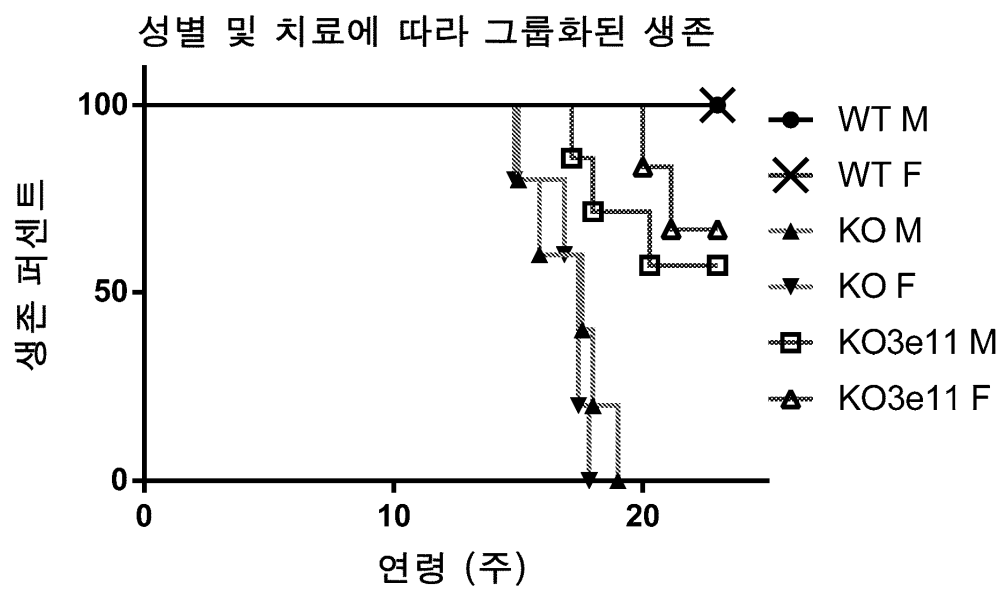
도면21b



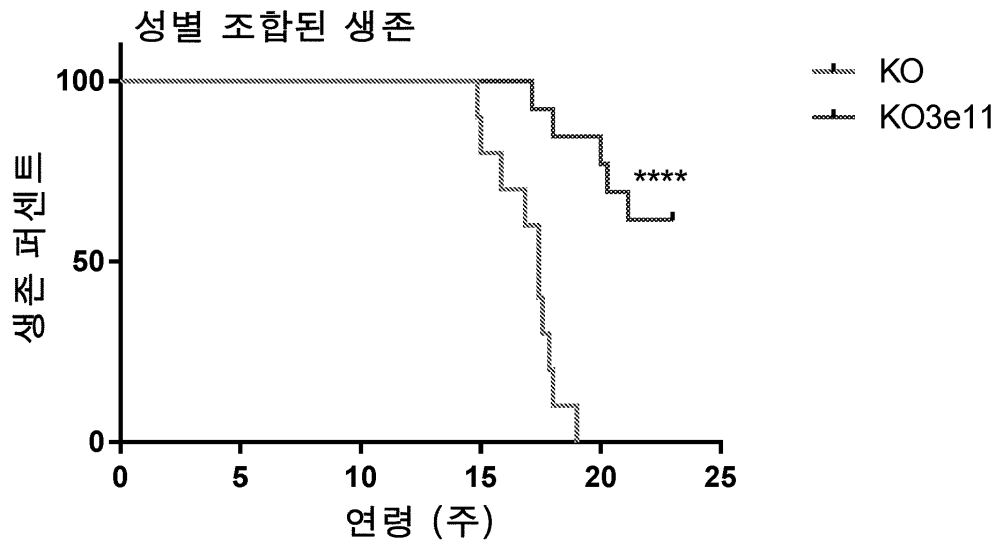
도면21c



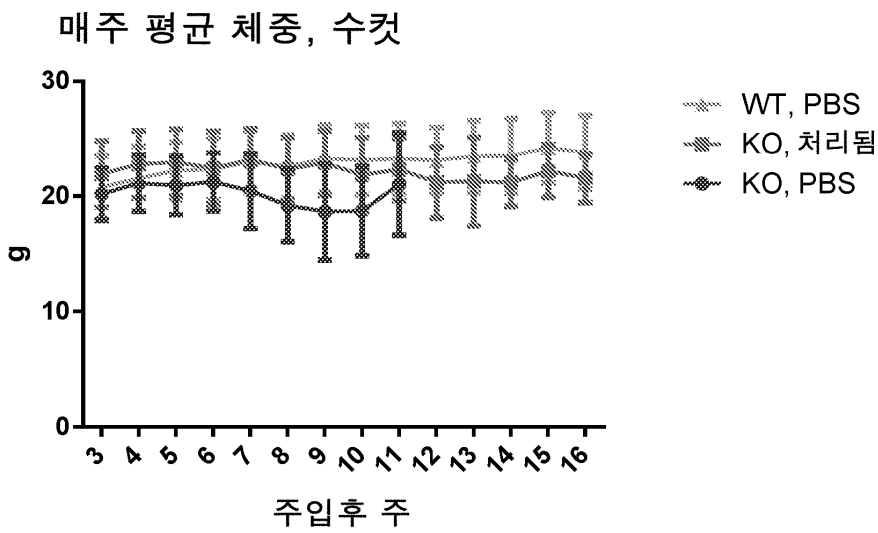
도면22a



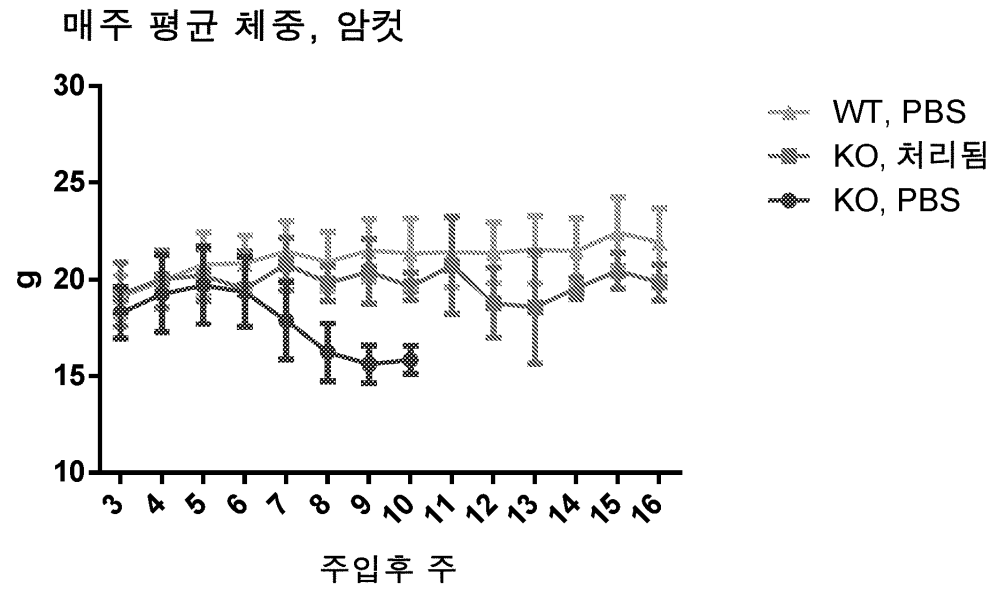
도면22b



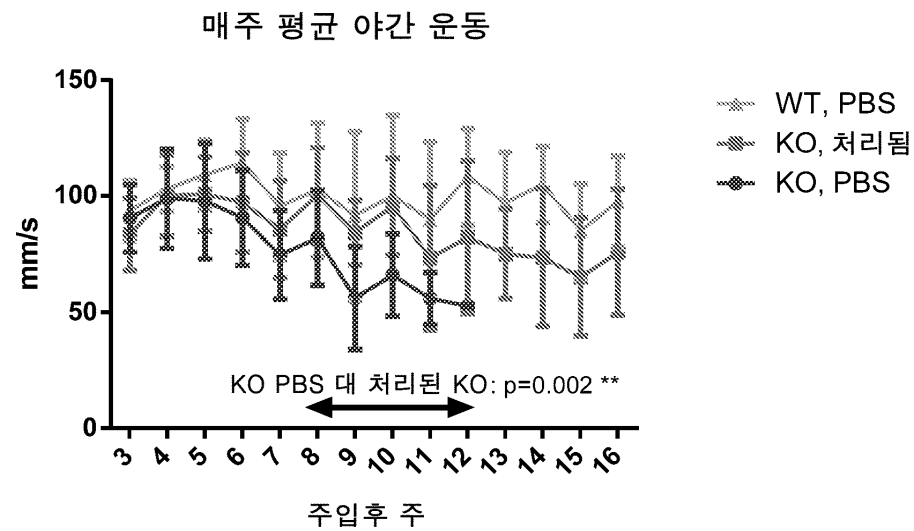
도면23a



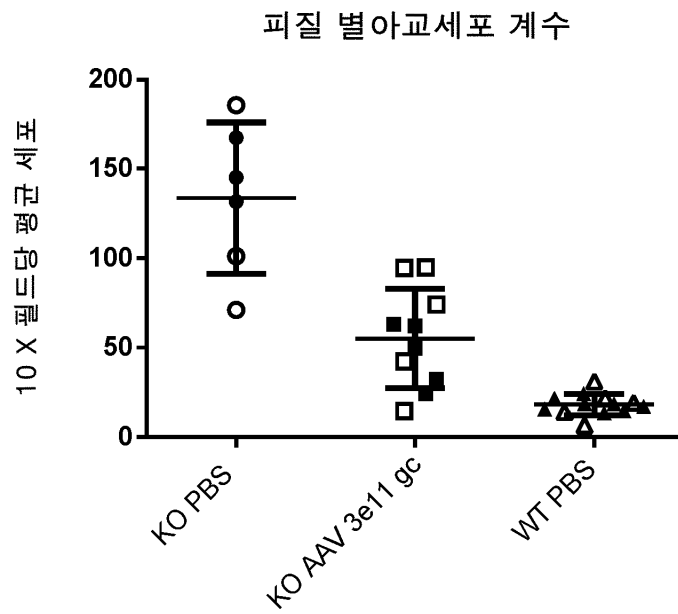
도면23b



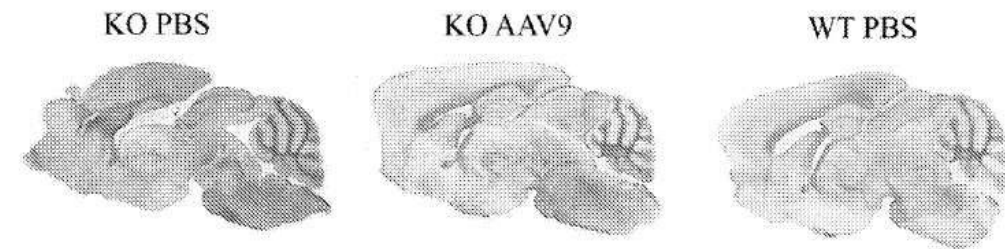
도면24



도면25a



도면25b



서열 목록

- <110> Trustees of the University of Pennsylvania
- <120> GENE THERAPY FOR NEURONAL CEROID LIPOFUSCINOSES
- <130> UPN-17-8151PCT
- <150> US 62/504,817
- <151> 2017-05-11
- <150> US 62/599,816
- <151> 2017-12-18
- <150> US 62/652,006
- <151> 2018-04-03
- <160> 8
- <170> KoPatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 563
- <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Leu Gln Ala Cys Leu Leu Gly Leu Phe Ala Leu Ile Leu Ser
1 5 10 15

Gly Lys Cys Ser Tyr Ser Pro Glu Pro Asp Gln Arg Arg Thr Leu Pro
20 25 30

Pro Gly Trp Val Ser Leu Gly Arg Ala Asp Pro Glu Glu Glu Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Phe Ala Leu Arg Gln Gln Asn Val Glu Arg Leu Ser Glu Leu
50 55 60

Val Gln Ala Val Ser Asp Pro Ser Ser Pro Gln Tyr Gly Lys Tyr Leu
65 70 75 80

Thr Leu Glu Asn Val Ala Asp Leu Val Arg Pro Ser Pro Leu Thr Leu

85 90 95

His Thr Val Gln Lys Trp Leu Leu Ala Ala Gly Ala Gln Lys Cys His
100 105 110

Ser Val Ile Thr Gln Asp Phe Leu Thr Cys Trp Leu Ser Ile Arg Gln
115 120 125

Ala Glu Leu Leu Leu Pro Gly Ala Glu Phe His His Tyr Val Gly Gly
130 135 140

Pro Thr Glu Thr His Val Val Arg Ser Pro His Pro Tyr Gln Leu Pro
145 150 155 160

Gln Ala Leu Ala Pro His Val Asp Phe Val Gly Gly Leu His Arg Phe
165 170 175

Pro Pro Thr Ser Ser Leu Arg Gln Arg Pro Glu Pro Gln Val Thr Gly
180 185 190

Thr Val Gly Leu His Leu Gly Val Thr Pro Ser Val Ile Arg Lys Arg
195 200 205

Tyr Asn Leu Thr Ser Gln Asp Val Gly Ser Gly Thr Ser Asn Asn Ser
210 215 220

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

225 230 235 240
 Ala Gln Phe Met Arg Leu Phe Gly Gly Asn Phe Ala His Gln Ala Ser
 245 250 255
 Val Ala Arg Val Val Gly Gln Gln Gly Arg Gly Arg Ala Gly Ile Glu
 260 265 270
 Ala Ser Leu Asp Val Gln Tyr Leu Met Ser Ala Gly Ala Asn Ile Ser
 275 280 285
 Thr Trp Val Tyr Ser Ser Pro Gly Arg His Glu Gly Gln Glu Pro Phe
 290 295 300

 Leu Gln Trp Leu Met Leu Leu Ser Asn Glu Ser Ala Leu Pro His Val
 305 310 315 320
 His Thr Val Ser Tyr Gly Asp Asp Glu Asp Ser Leu Ser Ser Ala Tyr
 325 330 335
 Ile Gln Arg Val Asn Thr Glu Leu Met Lys Ala Ala Ala Arg Gly Leu
 340 345 350
 Thr Leu Leu Phe Ala Ser Gly Asp Ser Gly Ala Gly Cys Trp Ser Val
 355 360 365
 Ser Gly Arg His Gln Phe Arg Pro Thr Phe Pro Ala Ser Ser Pro Tyr

 370 375 380
 Val Thr Thr Val Gly Gly Thr Ser Phe Gln Glu Pro Phe Leu Ile Thr
 385 390 395 400
 Asn Glu Ile Val Asp Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Phe Ser Asn Val Phe
 405 410 415
 Pro Arg Pro Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Val Thr Lys Phe Leu Ser Ser
 420 425 430
 Ser Pro His Leu Pro Pro Ser Ser Tyr Phe Asn Ala Ser Gly Arg Ala
 435 440 445

 Tyr Pro Asp Val Ala Ala Leu Ser Asp Gly Tyr Trp Val Val Ser Asn
 450 455 460
 Arg Val Pro Ile Pro Trp Val Ser Gly Thr Ser Ala Ser Thr Pro Val
 465 470 475 480
 Phe Gly Gly Ile Leu Ser Leu Ile Asn Glu His Arg Ile Leu Ser Gly

485 490 495
 Arg Pro Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Arg Leu Tyr Gln Gln His Gly
 500 505 510
 Ala Gly Leu Phe Asp Val Thr Arg Gly Cys His Glu Ser Cys Leu Asp

515 520 525
 Glu Glu Val Glu Gly Gln Gly Phe Cys Ser Gly Pro Gly Trp Asp Pro
 530 535 540
 Val Thr Gly Trp Gly Thr Pro Asn Phe Pro Ala Leu Leu Lys Thr Leu
 545 550 555 560
 Leu Asn Pro

<210> 2

<211> 1693

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgggactcc aagcctgcct cctagggtc tttgccctca tctctcttgg caaatgcagt 60

tacagcccgg agcccgacca gcggaggacg ctgccccag gctgggtgtc cctgggccgt 120

gcggaccctg aggaagagct gagtctcacc tttgccctga gacagcagaa tgtggaaga 180

ctctcggagc tgggtgcaggc tgtgtcggat ccagctctc ctcaatacgg aaaatacctg 240

accctagaga atgtggctga tctggtgagg ccatcccccac tgaccctcca cacggtgcaa 300

aatggctct tggcagccgg agcccagaag tgccattctg tgatcacaca ggactttctg 360

acttctgtgc tgagcatccg acaagcagag ctgctgtccc ctggggctga gtttcatcac 420

tatgtgggag gacctacga aacctatgt gtaaggtccc cacatcccta ccagcttcca 480

caggccttgg cccccatgt ggactttgtg gggggactgc accgttttcc cccaacatca 540

tccctgaggc aacgtcctga gccgcagggtg acagggactg taggcctgca tctgggggta 600

acccctctg tgatccgtaa gcgatacaac ttgacctcac aagacgtggg ctctggcacc 660

agcaataaca gccaagcctg tgcccagttc ctggagcagt atttccatga ctacagacctg 720

gtcagttca tgcgcctctt cgggtggcaac ttgacatc aggcatcagt agcccgtgtg 780

gttggaac agggccgggg ccggccgggg attgaggcca gtctagatgt gcagtacctg 840

atgagtgtg gtgccaacat ctccacctgg gtctacagta gccctggccg gcatgaggga 900

caggagccct tctgcagtg gctcatgctg ctcagtaatg agtcagccct gccacatgtg 960

catactgtga gctatggaga tgatgaggac tccctcagca ggcctacat ccagcgggtc 1020

aacactgagc tcatgaaggc tgccgctcgg ggtctcaccc tgcctttcgc ctcaggtgac 1080

agtggggccg ggtgttggtc tgtctctgga agacaccagt tccgccctac cttccctgcc 1140

tccagccct atgtaccac agtgggaggc acatccttc aggaaccttt cctcatcaca 1200

aatgaaattg ttgactatat cagtgggtgt ggcttcagca atgtgttccc acggccttca 1260

taccaggagg aagctgtaac gaagttcctg agctctagcc cccacctgcc accatccagt 1320

tacttcaatg ccagtggccg tgcctacca gatgtggctg cactttctga tggctactgg 1380

gtggtcagca acagagtgcc cattccatgg gtgtccgga cctcgccctc tactccagtg 1440

tttgggggga tctatcctt gatcaatgag cacaggatcc ttagtggccg ccccccttt 1500

ggctttctca acccaaggct ctaccagcag catggggcag gactctttga tgtaaccgt 1560

ggctgcatg agtcctgtc ggatgaagag gtagagggcc agggtttctg ctcgtgtcct 1620

ggctgggac ctgtaacagg ctggggaaca cccaacttc cagctttgct gaagactcta 1680

ctcaaccct gac 1693

<210> 3

<211> 1693

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 3

atgggactgc aggcctgtct gctgggactg ttgccctga tctgagcgg caagtgcagc 60

tacagcccg agccgacca gagaagaaca ctgcctccag gctgggtgtc cctgggcaga 120

gtgaccctg aagaggaact gagcctgacc ttgccctgc ggcagcagaa cgtggaaaga 180

ctgagcgagc tggatgcagg cgtgtccgat cctagcagcc ctcagtacgg caagtacctg 240

accttgaaa acgtggccga cctcgtgcgg cctagccctc tgacactgca caccgtgcag 300

aagtggctgc tggctgccgg cgctcagaaa tgccactccg tgatcaccca ggactttctg 360

acctgttggc tgagcatccg gcaggccgaa ctgctgtctc ctggggccga gtttcaccac 420

tatgtggcg gaccaccca gacacatgtc gtgcgcagcc cacaccctta ccagctgcca 480

caggctctgg cccctcacgt ggactttgtg ggaggcctgc acagattccc cccaaccagc 540

agcctgagac agaggcctga gccacaagt accggcacag tgggcctgca tctgggcgtg 600

acacctagcg tgatccgga gcggtacaac ctgaccagcc aggatgtggg cagcggcacc 660

agcaacaata gccaggcctg cgcccagttc ctggaacagt acttccacga cagcgatctg 720
gcccagttca tgcggctgtt cggcggcaac ttcgcacatc aggctagcgt ggccagagtc 780

gtgggccagc aggggaagagg cagagccgga attgaggcct ccctggacgt gcagtacctg 840
atgagcgctg gcgccaacat cagcacctgg gtgtacagca gcccggcag acacaggggc 900
caggaacctt ttctgcagtg gctgatctg ctgagcaacg agagcgccct gcctcatgtg 960
cacacagtgt cctacggcga cgacaggac agcctgagca gcgcctacat ccagagagtg 1020
aacaccgagc tgatgaaggc cgctgccagg ggactgacct tgctgtttgc ctctggcgat 1080
agcggagccg gctgttgag tgtgtcaggc cggcaccagt tcagaccac ctttctgcc 1140
agctccccct acgtgacaac cgtgggcggc acctccttc aggaacctt cctgatcacc 1200

aacgagatcg tggactacat cagcggcgga ggcttcagca acgtgttccc cagaccagc 1260
taccaggaag agccgtgac caagtctctg tctccagcc ctcctctgcc cccagctcc 1320
tacttcaacg ccagcggcag agcctacca gatgtggccg ctctgtccga cggctactgg 1380
gtggtgtcca acagagtgcc catccttgg gtgtccggca caagcgccag caccctgtg 1440
tttggcgga tctgtccct gatcaacgag cacagaatcc tgtccggcag acccccctg 1500
ggcttctga accctagact gtaccagcag cagggcgctg gcctgttcga tgtgaccaga 1560
ggctgccacg agagctgcct ggacaggaa gtggaaggcc agggcttctg ttctggcct 1620

ggctgggatc ctgtgaccgg atggggcacc cctaacttc cgcctctgt gaaaacactg 1680
ctgaacctt gat 1693

<210> 4
<211> 320
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Arg Leu Phe Gly Gly Asn Phe Ala His Gln Ala Ser Val Ala Arg
1 5 10 15
Val Val Gly Gln Gln Gly Arg Gly Arg Ala Gly Ile Glu Ala Ser Leu
20 25 30
Asp Val Gln Tyr Leu Met Ser Ala Gly Ala Asn Ile Ser Thr Trp Val
35 40 45
Tyr Ser Ser Pro Gly Arg His Glu Gly Gln Glu Pro Phe Leu Gln Trp
50 55 60

Leu Met Leu Leu Ser Asn Glu Ser Ala Leu Pro His Val His Thr Val
 65 70 75 80
 Ser Tyr Gly Asp Asp Glu Asp Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ile Gln Arg
 85 90 95
 Val Asn Thr Glu Leu Met Lys Ala Ala Ala Arg Gly Leu Thr Leu Leu
 100 105 110

 Phe Ala Ser Gly Asp Ser Gly Ala Gly Cys Trp Ser Val Ser Gly Arg
 115 120 125
 His Gln Phe Arg Pro Thr Phe Pro Ala Ser Ser Pro Tyr Val Thr Thr
 130 135 140
 Val Gly Gly Thr Ser Phe Gln Glu Pro Phe Leu Ile Thr Asn Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Asp Tyr Ile Ser Gly Gly Gly Phe Ser Asn Val Phe Pro Arg Pro
 165 170 175
 Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Val Thr Lys Phe Leu Ser Ser Ser Pro His

 180 185 190
 Leu Pro Pro Ser Ser Tyr Phe Asn Ala Ser Gly Arg Ala Tyr Pro Asp
 195 200 205
 Val Ala Ala Leu Ser Asp Gly Tyr Trp Val Val Ser Asn Arg Val Pro
 210 215 220
 Ile Pro Trp Val Ser Gly Thr Ser Ala Ser Thr Pro Val Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Leu Ile Asn Glu His Arg Ile Leu Ser Gly Arg Pro Pro
 245 250 255

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

<210> 5

<211> 6841

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 5

tcgaggacgg ggigaactac gcctgaggat ccgatctttt tccctctgcc aaaaattatg	60
gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa ttatttttca	120
ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aagcaattcg ttgatctgaa	180
tttcgaccac ccataatacc cattaccctg gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt	240
aactacaagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc	300
actgaggcgg ggcgacaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagt	360
agcgagcgag cgcgagcct taattaacct aattcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt	420
gactgggaaa accctggcgt taccctactt aatcgcttg cagcacatcc ccttttcgcc	480
agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg	540
aatggcgaat gggacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg	600
cgcagcgtga ccgtacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcttttcgc tttcttcct	660
tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gtcctcttta	720
gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgatta gggatgatgt	780
tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg	840
ttctttaata gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaacctat ctcggtctat	900
tcctttgatt tataagggat ttgcccatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt	960
taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta ggtggcactt	1020
ttcggggaaa tgtgcgcgga accctatctt gtttattttt ctaaatacat tcaaataatgt	1080
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcctcaata atattgaaaa aggaagagta	1140
tgagtattca acatttcctg gtcgccccta ttcctttttt tgcggcattt tgccttcctg	1200
tttttgccta ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	1260
gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat ccttgagagt tttcgccccg	1320
aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc	1380
gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg	1440
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	1500

gcagtgtctgc cataacatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg	1560
gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg	1620
atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	1680
ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt	1740
cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct	1800
cggcccttcc ggctggctgg tttattgtctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc	1860
gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	1920
cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgtgag ataggtgcct	1980
cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt	2040
taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat aatctcatga	2100
ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca	2160
aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac	2220
caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	2280
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag	2340
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac	2400
cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	2460
taccggataa ggcgagcggc tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg	2520
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc	2580
ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc	2640
gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc	2700
acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcgagc ctatggaaaa	2760
acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt	2820
tctttctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt gagttagctg	2880
ataccgtcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaag	2940
agcgcccaat acgcaaaccg cctctccccg cgcgttggcc gattcattaa tgcagctggc	3000
acgacaggtt tcccgaactg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc	3060
tactcatta ggcacccgag gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgtgtggaa	3120
ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac gccagattta	3180
attaaggcct taattaggct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccg ggcaaagccc	3240

gggcgtcggg cgacctttgg tcgcccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg cagagaggga	3300
giggccaact ccatcactag gggttccttg tagttaatga ttaacccgcc atgtactta	3360
tctaccaggg taatggggat cctctagaac tatagctagt cgacattgat tattgactag	3420
ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt	3480
tacataactt acggtaaatg gcccgcttgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac	3540
gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg	3600
ggtggactat ttacggtaaa ctgcccactt ggagctacat caagtgtatc atatccaag	3660
tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg ccagctacat	3720
gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat	3780
ggtcgagggtg agccccacgt tctgtttcac tctcccac cccccccct cccaccccc	3840
aattttgtat ttatttat ttttaattatt ttgtgcagcg atgggggcgg gggggggggg	3900
ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg	3960
tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt ccttttatgg cgaggcggcg	4020
gcggcggcgg cctataaaa agcgaagcgc gcggcggcgg gggagtcgt gcgacgtgc	4080
cttcgccccg tgccccgctc cgccgcccgc tcgcgcccgc cggcccggct ctgactgacc	4140
gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcctttctc ctccgggctg taattagcgc	4200
ttggtttaat gacggcttgt ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg	4260
gagggccctt tgtgcggggg gagcggtcgc gggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtggg	4320
agcgccgcgt gcggctccgc gctgcccggc ggtgtgtgagc gctgcgggcg cggcgcgggg	4380
ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcgcccg ggggcggtgc cccgcggtgc	4440
ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca	4500
gggggtgtgg gcgcgtcgtt cgggctgcaa cccccctgc accccctcc ccgagttgt	4560
gagcacggcc cggtctcggg tgcggggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgccgtg	4620
ccgggcgggg ggtggcgcca ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccgcc tcgggccggg	4680
gagggtcgg gggaggggcg cggcgccccc cggagcgccg gcggctgtcg aggcgcggcg	4740
agccgcagcc attgcctttt atggtaatcg tgcgagaggg cgcagggact tcctttgtcc	4800
caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgcgcgcga cccctctag cgggcgcggg	4860
gcgaagcgtt gcggcgcccg caggaaggaa atggcgggg agggccttcg tgcgtcgccg	4920
cgccgccgtc cctttctccc tctccagct cggggctgtc cgcgggggga cggctgcctt	4980

cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc	5040
tctgctaacc atgttcacgc cttcttcttt ttctacagc tcctgggcaa cgtgctggtt	5100
attgtgctgt ctcatcatit tggcaaagaa ttcacgcgtg ccaccatggg actgcaggcc	5160
tgtctgctgg gactgttcgc cctgatcctg agcggcaagt gcagctacag ccccagagcc	5220
gaccagagaa gaacactgcc tccaggctgg gtgtccctgg gcagagctga ccctgaagag	5280
gaactgagcc tgaccttcgc cctgcggcag cagaacgtgg aaagactgag cgagctggtg	5340
caggccgtgt ccgatcctag cagccctcag tacggcaagt acctgaccct ggaaaacgtg	5400
gcccacctcg tgccgcctag cctctgaca ctgcacaccg tgcagaagtg gctgctggct	5460
gcccgcgctc agaaatgcca ctccgtgac acccaggact ttctgacctg ttggctgagc	5520
atccggcagg ccgaactgct gctgcctggg gccgagtttc accactatgt gggcggagcc	5580
accgagacac atgtcgtcg cagccacac cttaccagc tgccacagc tctggccct	5640
cactggact ttgtgggagg cctgcacaga ttcccccaa ccagcagcct gagacagagg	5700
cctgagccac aagtgaccgg cacagtgggc ctgcactctg gcgtgacacc tagcgtgac	5760
cggaagcggg acaacctgac cagccaggat gtgggcagcg gcaccagcaa caatagccag	5820
gcctgcgccc agttcctgga acagtacttc cacgacagcg atctggcca gttcatgcgg	5880
ctgttcggcg gcaacttcgc acatcaggct agcgtggcca gagtctggg ccagcaggga	5940
agaggcagag ccggaattga ggcctccctg gacgtgcagt acctgatgag cgctggcgcc	6000
aacatcagca cctgggtgta cagcagcccc ggcagacacg agggccagga accttttctg	6060
cagtggctga tgctgctgag caacgagagc gccctgcctc atgtgcacac agtgtcctac	6120
ggcgacgacg aggacagcct gagcagcgcc tacatccaga gagtgaacac cgagctgatg	6180
aaggccgctg ccaggggact gacctgctg ttgacctctg gcgatagcgg agccggctgt	6240
tgagtggtgt caggccggca ccagttcaga cccacctttc ctgccagctc cccctacgtg	6300
acaaccgtgg gcggcacctc ctttcaggaa ccttctctga tcaccaacga gatcgtggac	6360
tacatcagcg gcggaggctt cagcaactgt ttccccagac ccagctacca ggaagaggcc	6420
gtgaccaagt tctgtcctc cagccctcat ctgccccca gctcctactt caacgccagc	6480
ggcagagcct acccagatgt ggccgctctg tccgacggct actgggtggt gtccaacaga	6540
gtgccatcc cttgggtgtc cggcacaagc gccagcacc ctgtgttttg cggtatcctg	6600
tcctgatca acgagcacag aatcctgtcc ggcagacccc cctgggctt cctgaacct	6660
agactgtacc agcagcacgg cgctggcctg ttcatgtga ccagaggctg ccacgagagc	6720
tgcttgagc aggaagtga aggccaggc ttctgttctg gccctggctg ggatcctgtg	6780
accgatggg gcaccctaa cttccccgc ctgctgaaaa cactgctgaa cccctgatga	6840

c

6841

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 9

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

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

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

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

370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

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

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

515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr

660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705	710	715	720
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu			
	725	730	735
<210> 7			
<211> 2211			
<212> DNA			
<213> adeno-associated virus 9			
<400> 7			
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca accitagtga aggaattcgc			60
gagtgggtggg ctttgaaacc tggagcccct caaccaagg caaatcaaca acatcaagac			120
aacgctcgag gtcttgtgt tccgggttac aaataccttg gaccggcaa cggactcgac			180
aagggggagc cggtaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac			240
cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc			300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag			360
gcaaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggttaa gacggctcct			420
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggatattggc			480
aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag			540
tcagtcccag acctcaacc aatcgagaga cctcccgag cccctcagg tgtgggatct			600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga			660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac			720
accaccagca ccgaacctg ggccctgcc acctacaaca atcacctcta caagcaatc			780
tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc			840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccattct caccacgtga ctggcagcga			900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt			960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc			1020
acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccg acgtgctcgg gtcggctcac			1080
gagggtgcc tcccgcgtt cccagcggac gttttcatga ttctcagta cgggtatctg			1140
acgttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc			1200
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta			1260
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcacc			1320
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg			1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct	1440
ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaataca caacagcgaa	1500
tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct	1560
ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gcttgatct	1620
ttaatttttg gcaacaaggg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcagtata	1680
accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg	1740
gccacaaacc accagagtcg ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga	1800
atacttcagg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc	1860
aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg	1920
aagcaccgcg ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tctccaacg	1980
gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcaccaggt attctactgg ccaagtcagc	2040
gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccg ggagatccag	2100
tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaagggtga	2160
tatagtgaac cccgcccatt tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a	2211
<210> 8	
<211> 4020	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> constructed sequence	
<400> 8	
ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttctt ttagttaat gattaaccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaataat	240
tacggggta ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggcccgctt ggctgaccgc ccaacgacc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggt	420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgtattacc atggtcgagg tgagccccc	600
gttctgcttc actctccca tctcccccc cccccccc ccaattttgt atttattat	660

ttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggggcgcg cgccaggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttctttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggcctataa	840
aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgt gccttcgccc cgtgccccgc	900
tccgccgcgc cctcgcgcgc cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg	960
agcggggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggcctt	1020
gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtcggg	1080
gggagcggct cggggggcgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcggcgc gtgcggctcc	1140
gcgtgccccg gcggctgtga gcgtgcggg cgcggcggcgg ggctttgtgc gctccgcagt	1200
gtgcgcgagg ggagcgggc cgggggcggc gccccgcggc gcgggggggg ctgcgagggg	1260
aacaaaggct gcgtgcggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg	1320
gtcgggctgc aacccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg	1380
ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggtctgccg tgccgggcgg ggggtggcgg	1440
caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggcgg gggagggctc gggggagggg	1500
cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgagggcggc cgagccgcag ccattgcctt	1560
ttatggtaat cgtgcgagag ggcgagggga ctctcttgt cccaaatctg tgcggagccg	1620
aaatctggga ggcgcgcgcg caccctctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgc	1680
ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgcgc tcccccttc	1740
cctctccagc ctgcgggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acggggcagg	1800
gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat	1860
gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat	1920
tttggcaaag aattcacgcg tgccaccatg ggactgcagg cctgtctgct gggactgttc	1980
gccctgatcc tgagcggcaa gtgcagctac agccccgagc ccgaccagag aagaacactg	2040
cctccaggct ggggtgtcctt gggcagagct gacctgaag aggaactgag cctgaccttc	2100
gccctgcggc agcagaacgt ggaaagactg agcgagctgg tgcaggcgt gtccgatcct	2160
agcagccctc agtacggcaa gtacctgacc ctggaaaacg tggccgacct cgtgcgcct	2220
agccctctga cactgcacac cgtgcagaag tggtctgtgg ctgccggcgc tcagaaatgc	2280
cactccgtga tcaccagga ctttctgacc tgttggctga gcatccggca ggccgaactg	2340
ctgtgcctg gggccgagtt tcaccactat gtgggcggac ccaccgagac acatgtcgtg	2400
cgcagccac acccttacca gctgccacag gctctggccc ctacgtgga ctttgtggga	2460
ggcctgcaca gattcccc aaccagcagc ctgagacaga ggcctgagcc acaagtgacc	2520

ggcacagtgg gcctgcatct gggcgtgaca cctagcgtga tccggaagcg gtacaacctg	2580
accagccagg atgtgggcag cggcaccagc aacaatagcc aggctgcgc ccagttcctg	2640
gaacagtact tccacgacag cgatctggcc cagttcatgc ggctgttcgg cggcaacttc	2700
gcacatcagg ctagcgtggc cagagtcgtg ggccagcagg gaagaggcag agccggaatt	2760
gaggcctccc tggacgtgca gtacctgatg agcgtcggcg ccaacatcag cacctgggtg	2820
tacagcagcc cggcagaca cgagggccag gaaccttttc tgcagtggct gatgctgctg	2880
agcaacgaga gcgccctgcc tcatgtgcac acagtgtcct acggcgacga cgaggacagc	2940
ctgagcagcg cctacatcca gagagtgaac accgagctga tgaaggccgc tgccagggga	3000
ctgaccctgc tgtttgcctc tggcgatagc ggagccggct gttggagtgt gtcaggccgg	3060
caccagttca gaccacctt tctgccagc tccccctacg tgacaaccgt gggcggcacc	3120
tcctttcagg aacctttcct gatcaccaac gagatcgtgg actacatcag cggcggaggc	3180
ttcagcaacg tgttccccag acccagctac caggaagagg ccgtgaccaa gttcctgtcc	3240
tccagccctc atctgcccc cagctcctac ttcaacgcca gcggcagagc ctaccagat	3300
gtggcgcctc tgtccgacgg ctactgggtg gtgtccaaca gagtgcccat cccttgggtg	3360
tccggcacia gcgccagcac ccctgtgttt ggccggcatcc tgtccctgat caacgagcac	3420
agaatcctgt ccggcagacc cccctgggc ttctgaacc ctagactgta ccagcagcac	3480
ggcgtcggcc tgttcgatgt gaccagaggc tgccacgaga gctgcctgga cgaggaagtg	3540
gaaggccagg gcttctgttc tggccctggc tgggatcctg tgaccgatg gggcaccct	3600
aacttccccg cctgctgaa aacactgctg aaccctgat gactcgagga cggggtgaac	3660
tacgcctgag gatccgatct ttttcctct gccaaaaatt atggggacat catgaagccc	3720
cttgagcacc tgacttctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg	3780
aatTTTTTgt gtctctcact cggaagcaat tcgttgatct gaatttcgac caccataat	3840
accattacc ctggtagata agtagcatgg cgggttaatc attactaca aggaaccct	3900
agtgatggag ttggccactc cctctctcgc cgtcgtctcg ctcactgagg ccgggcgacc	3960
aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgcccg ggccgcctca gtgagcgagc gagcgcgag	4020
	4020