(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월22일
(11) 등록번호 10-2581652
(24) 등록일자 2023년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 35/76* (2015.01)
A61K 38/47 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 35/76 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7043023(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2021년12월29일
(85) 번역문제출일자 2021년12월29일
(65) 공개번호 10-2022-0005599
(43) 공개일자 2022년01월13일
(62) 원출원 특허 10-2015-7022504
원출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2019년03월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/025509
(87) 국제공개번호 WO 2014/151341
국제공개일자 2014년09월25일
(30) 우선권주장
61/788,724 2013년03월15일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130138778 A
KR1020180121899 A

(73) 특허권자
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베니아
미국 펜실베니아 필라델피아 (우편번호 19104) 월넛 스트리트 3451 7플로어
(72) 발명자
거다 브리트니 엘.
미국 펜실바니아 19426 컬리지빌 크리에벨 밀 로드 1152
윌슨 제임스 엠.
미국 펜실바니아 19342 글렌 밀스 폴브룩 레인 7
(74) 대리인
특허법인와이에스장

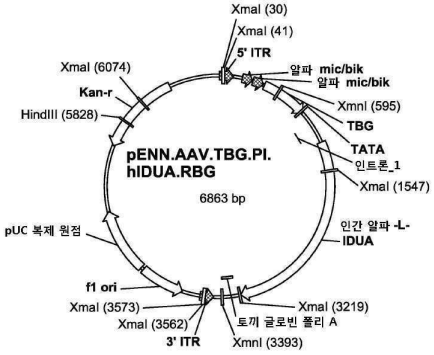
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **MPSI 치료를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

서열 번호 1의 서열, 또는 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는 hIDUA 유전자를 함유하는 발현 카세트를 갖는 벡터가 제공된다. 이 벡터는 생산 벡터 또는 rAAV8일 수 있다. 이 벡터를 함유하는 조성물 및 MPSI과, 헐러(Hurler) 증후군, 헐러-샤이에(Scheie) 증후군 및 샤이에 증후군과 연관된 증상을 치료하는 방법이 또한 제공된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 38/47 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 302/01076 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

숙주 세포에서 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자 생산 방법으로서, 적어도 (a) 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의, 인간 α-L-이두로니다아제 (hIDUA) 유전자를 포함하는 발현 카세트로서, 상기 발현 카세트는 이의 5' 말단 및 3' 말단에서 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되고(flanked), 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1의 서열을 가지는, 발현 카세트, (b) rep 단백질을 코딩하는 rep 서열, 및 (c) AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 발현 카세트를 AAV 캡시드에 패키징하기에 충분한 헬퍼 서열을 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계를 포함하고, 이때, 배양된 숙주 세포는 rep 및 AAV 캡시드 단백질을 발현하고, 발현 카세트를 조립된 캡시드로 패키징하여 rAAV 입자를 생성하는, 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 숙주 세포는 포유동물 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2 항에 있어서, tnrwn 세포는 HEK293 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서, 조절 서열은 간 특이적 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4 항에 있어서, 프로모터는 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1 항에 있어서, AAV 캡시드는 AAV8 및 AAV9로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1 항에 있어서, ITR 서열은 전장 ITR 또는 하나 또는 둘 모두의 ITR은 절두형(truncated)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 rAAV.

청구항 9

(a) 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의, 인간 α-L-이두로니다아제 (hIDUA) 유전자를 포함하는 발현 카세트로서, 상기 발현 카세트는 이의 5' 말단 및 3' 말단에서 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 서열에 의해 플랭킹되고(flanked), 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1의 서열을 가지는, 발현 카세트, (b) rep 서열, 및 (c) AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열 및 (d) 발현 카세트를 AAV 캡시드에 패키징하기에 충분한 헬퍼 서열을 포함하는 시험관내 패키징 숙주세포.

청구항 10

제9 항에 있어서, 조절 서열은 간 특이적 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 시험관내 패키징 숙주세포.

청구항 11

제10 항에 있어서, 간 특이적 프로모터는 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터인 것을 특징으로 하는 시험관내

패키징 숙주세포.

청구항 12

제I형 점액다당류증(MPS I) 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 또는 제9 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 따르는 시험관내 패키징 숙주세포로부터 제조된 rAAV 바이러스 입자의 유효량을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제12 항에 있어서, rAAV는 kg 당 rAAV 바이러스 입자의 3×10^{9} 내지 3×10^{12} 게놈 카피를 포함하는 투여량으로 제제화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 점액다당류증은 뮤코다당류로도 칭해지는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan; GAG)의 분해에 연루된 특정 리소좀 효소의 결여에 의해 야기되는 일군의 유전성 질환이다. 부분 분해된 GAG의 축적은 세포, 조직 및 기관의 기능의 방해를 야기한다. 시간이 지남에 따라, GAG는 세포, 혈액 및 결합 조직 내에서 축적되어 세포 및 기관 손상을 증가시킨다. 가장 심각한 점액다당류증(MPS) 질환인 MPS I은 α-L-이두로니다아제(IDUA) 효소의 결함에 의해 야기된다. 이는 중증도 순으로 헐러(Hurler) 증후군, 헐러-샤이에(Scheie) 증후군 및 샤이에 증후군인 3가지의 임상 증후군에 이르게 된다. 각각은 효소 결함이 임상 표현형의 중증도에 직접적으로 관련되는 정도에 의해 상염색체 열성 방식으로 유전된다.

[0002] IDUA 유전자는 글리코사미노글리칸(GAG)으로 칭해지는 큰 당 분자의 분해에 필수적인 α-L-이두로니다아제로 칭해지는 효소의 생성을 위한 지시를 제공하는 것으로 보고되었다. 구체적으로, α-L-이두로니다아제는 헤파란 술페이트 및 더마탄 술페이트로 칭해지는 2가지 GAG에 존재하는 술페이트화(sulfated) α-L-이두론산으로 공지된 분자로부터 술페이트를 제거하는 것으로 보고되어 있다. α-L-이두로니다아제는 상이한 유형의 분자를 소화시키고 재활용하는 세포 내의 구획인 리소좀에 위치한다. IDUA 유전자 내에서의 100개 초과의 돌연변이가 제I형 점액다당류증(MPS I)을 야기하는 것으로 밝혀졌다. 하나의 DNA 빌딩 블록(building block)(뉴클레오티드)을 변화시키는 돌연변이가 가장 일반적이다. MPS I을 야기하는 돌연변이는 α-L-이두로니다아제의 기능을 감소시키거나 또는 완전히 제거한다.

[0003] 임상 증후군과 관련하여, 헐러 증후군의 현재의 관리 표준으로는 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplantation; HSCT), 예컨대 골수 이식(bone marrow transplantation; BMT) 또는 제대혈 이식(umbilical cord blood transplantation; UCBT)이 있다. 당해 절차는 상기 질병의 체성(somatic) 측면 및 CNS 측면 둘 모두에 영향을 주기 위하여 가능한 한 빨리, 2세 이전에 행해진다. 그러나, MPS I을 위한 HSCT는 상당한 양의 이환율 및 20%의 사망률과 연관된 채로 있다. 이식이 옵션(option)이 아니라면, 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy; ERT)이 시작될 수 있는데, 이는 환자의 일생 동안 효소의 매주 주입을 필요로 한다. ERT는 CNS 질환의 진행에 영향을 주지 않지만, 체성 소견을 부분적으로 개선시킨다. 장기종대(Organomegaly)가 유의하게 개선되지만, 골격계, 눈 및 심장에서의 상기 질병의 측면은 단지 부분적으로 개선된다. 환자는 둔부 및 무릎을 안정화시키기 위하여 그리고 수근관 증후군 및 손가락 수축을 치료하기 위하여 수술을 필요로 할 수 있다. 심장 질환은 의학적으로 치료되지만, 수술이 결국 필요해질 수 있다.

[0004] MPS I을 위한 ERT는 GAG의 리소좀 내로의 흡수 및 이화작용의 증가를 위한 외인성 효소를 제공한다. 리소좀 효소가 내부적으로 기능하지만, 세포 표면 만노스-6-포스페이트 수용체는 이러한 효소를 리소좀에 결합시키고, 내부화하고, 전달하는 것이 가능하다. 재조합 IDUA (알두라자임(Aldurazyme)®, 바이오마린(BioMarin))는 헐러형 및 헐러-샤이에형의 MPS I을 갖는 환자용으로, 그리고 중등도 내지 중증도 증상을 갖는, 샤이에형을 갖는 환자용으로 FDA에 의해 승인되어 있으며, 이는 폐기능 및 보행 능력을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 ERT는 MPS I 환자에 있어서 간비대를 감소시키고, 이외에도 소변 중 GAG의 수준을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 그러나,

정맥내 효소는 뇌 내로 용이하게 가로질러 들어가지 못하기 때문에, ERT는 현재 일부 MPS I 환자가 경험하는 신경학적 증상에 대처하지 못한다.

[0005] ERT의 합병증은 국소 및 전신 감염과 같은 평생 말초 접근의 합병증 뿐만 아니라 경도 내지 말기 아나필락시스의 범위일 수 있는, 재조합 효소에 대한 면역 반응을 중심으로 돌아간다. 알두라자임을 받은 환자의 91% 이하는 상기 효소에 대한 항체를 발달시키지만, 이것이 효능에 얼마나 많은 영향을 주는지는 명확하지 않다. 더욱이, ERT는 병원 시설에서 3 내지 8시간의 기간에 걸쳐 투여되는 매주 정맥내(i.v.) 주입을 필요로 하는데, 이는 환자의 삶의 질에 유의하게 영향을 주며, 높은 비용으로 인해 건강 관리 보상 시스템에 관한 주요한 부담이다.

[0006] 이러한 제한을 고려하면, MPS I과 연관된 이환율을 더 효과적으로 바로잡을 수 있는 치료법은 여전히 충족되지 않은 의학적 필요성이다.

발명의 내용

[0007] 일 측면에서, 본 발명은 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열 또는 인간 세포에서의 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는 인간 α-L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자를 포함하는 발현 카세트를 제공하며, 여기서, 상기 발현 카세트는 인간 세포에서 인간 α-L-이두로니다아제의 발현을 유도하는 조절 제어 서열을 추가로 포함하고, 상기 조절 제어 서열은 간 특이적 프로모터를 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 이 발현 카세트를 함유하는 벡터를 제공한다. 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 시스(cis) 플라스미드 상에 위치한다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 pENN.TBG.hIDUA.nRBG 상에 위치한다.

[0008] 또 다른 측면에서, 본 발명은 아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus; AAV) 캡시드(capsid)를 갖고, 상기 캡시드 내에 패키징된(packaged) 좌측 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat; ITR), 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의 인간 α-L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자 및 AAV 우측 ITR을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자를 제공하며, 여기서, 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1로 나타낸 서열 (도 1), 또는 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는다. 일 실시 형태에서, 기능성 hIDUA 유전자는 간 특이적 프로모터의 제어 하에 발현된다. 이러한 프로모터는 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터일 수 있다.

[0009] 추가의 측면에서, 본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스 입자 AAV2/8.TBG.hIDUA.co를 제공한다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기술된 발현 카세트를 포함하는 rAAV 및 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 제I형 점액다당류증(MPS I)의 치료에 유용한 조성물을 제공한다.

[0011] 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 제약상 허용가능한 담체 및 본원에 기술된 rAAV를 포함하는 유효량의 조성물을 전달하는 단계를 포함하는, 제I형 점액다당류증의 치료 방법을 제공한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군의 증상을 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면 및 이점은 [발명을 실시하기 위한 구체적인 내용]으로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a 내지 도 1d는 본원에 기술된 pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG 플라스미드의 서열 [서열 번호 3]을 제공하며, 이는 기능성 인간 IDUA 유전자의 핵산 서열을 포함한다. 도 1의 위치 1251-3213에 위치한 기능성 IUDA의 유전자 및 그의 코딩된 효소 서열이 서열 번호 1 및 2에 또한 제공되어 있다. 서열에는 추가로, 알파 mic/bik 인핸서, 인트론 1, 토끼 글로빈 폴리 A, ITR, 복제 원점의 서열이 확인되도록 주석을 단다.

도 2는 pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG의 원형 지도를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본원에 기술된 조성물은 인간 대상체에서 치료적 유효량의 기능성 인간 α-L-이두로니다아제 효소를 발현하는 인간 IDUA 유전자를 갖는 발현 카세트를 제공한다.

[0016] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은 표적 세포에서 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군, 및/또는 MPS I의 증상을 개선시키거나 치료하기에 충분한 양의 효소를 전달 및 발현하는 조성물의 양을 나타낸다.

"치료"는 상기 증후군 중 1가지 (또는 MPS I)의 증상의 악화의 방지 및 가능하게는 이의 증상 중 1가지 이상의 역전을 포함할 수 있다.

[0017] 본원에서 사용되는 바와 같이, "기능성 인간 α-L-이두로니다아제"는 MPS1 또는 연관 증후군, 예컨대 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군 없이 인간에 있어서 정상적으로 기능하는 인간 α-L-이두로니다아제 효소를 나타낸다. 역으로, 이들 증후군 중 1가지 또는 MPS1을 야기하는 인간 α-L-이두로니다아제 효소 변이체는 비기능성으로 간주된다. 일 실시 양태에서, 기능성 인간 α-l-이두로니다아제는 서열 번호 2 (653개 아미노산)에 재현되어 있는, NCBI 기준 서열 NP_000194.2, 문헌[Bremer et al., Mol. Genet. Metab. 104 (3): 289-294 (2011)]에 기술된 야생형 인간 α-L-이두로니다아제의 아미노산 서열을 갖는다. 그러나, 이 서열의 몇몇 자연 발생 기능성 다형성 (변이체)이 기술되었으며, 이는 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다. 이들 변이체는 서열 번호 2를 참조하면, 위치 110에서 N-결합형 글리코실화(문헌[Chen et al., J Proteome Res., 8:651-661 (2009)]), 아미노산 위치 33에서 H에서 Q로의 변화 [서열 번호 7, VAR_003350; 문헌[Scott, HS, et al., Proc Natl Acad. Sci, 88:9695-9699 (1991)]; 문헌[Scott, HS, et al., Genomics, 12: 1311-1313 (1992)]; 문헌[Scott HS, et al., Hum Genet, 90:327-327 (1992)]; 문헌[Bertola F., et al., Hum Mutat, 32: E2189-E2210 (2011)]], 아미노산 위치 82에서 H의 Q로의 환원 [서열 번호 8, VAR_020976; 상기에 인용된 문헌[Scott, HS, Hum Genet]], 위치 105에서 R에서 Q로의 변화 [서열 번호 9, VAR_003356; 상기에 인용된 문헌[Scott, HS, Hum Genet]; 상기에 인용된 버톨라(Bertola) 등의 문헌], 위치 116에서 G에서 R로의 변화 [서열 번호 10, VAR_003367], 위치 279에서 V에서 A로의 변화 [서열 번호 11, VAR_003359], 위치 346에서 L에서 R로의 변화 [서열 번호 12, VAR_017436, 문헌[Teng, YN, et al., Clin. Genet, 57: 131-136 (2000)]], 위치 361에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 13, VAR_003364; 문헌[Scott, HS, et al., Hum Mol Genet, 2: 1471-1473 (1993)]; 문헌[Yogalingam et al., Hum Mutat, 24: 199-207 (2004)]; 상기에 인용된 버톨라 등의 문헌], 위치 449에서 H에서 N으로의 변화 [서열 번호 14, VAR_066228, 상기에 인용된 버톨라 등의 문헌], 위치 454에서 V에서 I로의 변화 [서열 번호 15, VAR_003372; 상기에 인용된 요갈링엄(Yogalingam) 등의 문헌; 상기에 인용된 버톨라 등의 문헌], 위치 591에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 16, VAR_0066231, 상기에 인용된 버톨라 등의 문헌], 및 위치 622에서 A에서 T로의 변화 [서열 번호 17, 상기에 인용된 문헌[Scott et al., Genomics]]를 포함한다. 예를 들어, UniProtKB/Swiss-Prot; www.uniprot.org/uniprot/P35475를 참조한다. 또 다른 실시 양태에서, 기능성 인간 α-L-이두로니다아제는 리더 (시그널) 펩티드에 상응하는, 서열 번호 2의 처음 26개 아미노산의 전부 또는 일부분이 이종성 리더 펩티드로 대체된 합성 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 효소를 그의 분비 경로를 통하여 세포의 외부로 순환계 내로 수송하는 데 책임이 있는 이러한 리더 펩티드는 예를 들어 인터류킨-2(IL-2) 또는 온코스타틴(oncostatin) 유래의 리더 펩티드와 같은 또 다른 적합한 리더 펩티드로 치환될 수 있다. 적합한 리더 펩티드는, 반드시 그러할 필요는 없지만, 바람직하게는 인간 기원의 것이다. 적합한 리더 펩티드는 본원에 참고로 포함된 http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/zhang270.htm으로부터 선택될 수 있거나, 선택된 단백질에서 리더 (시그널) 펩티드를 결정하기 위한 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 결정될 수 있다. 한정되는 것은 아니지만, 이러한 서열은 길이가 약 15개 내지 약 50개 아미노산이거나, 길이가 약 20개 내지 약 28개 아미노산일 수 있거나, 필요할 경우 이보다 더 크거나 더 작을 수 있다. 게다가, 1가지 이상의 시험관내(in vitro) 검정법이 IDUA 효소의 효소 활성의 평가에 유용한 것으로 기술되었다 [예를 들어, 문헌[Kakkis et al., Mol Genet Metabol, 2001 Mar; 72(3): 199-208] 참조].

[0018] 적합하게는, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 치료적 용량의 장기적인 반복된 매주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 본원에 기술된 방법은 MPSI 질환과 연관된 체성 증상에 더하여 중추 신경계 표현형을 바로잡는 데 유용한 것으로 생각된다.

[0019] 발현 카세트

[0020] 발현 카세트는 최소한 유전자 및 그의 조절 서열로 구성된다. 카세트가 재조합 아데노 연관 바이러스로부터 발현되도록 설계될 경우, 발현 카세트는 5' 및 3' AAV 반전 말단 반복부(ITR)를 추가로 함유한다. 이들 ITR은 전장 ITR일 수 있거나, ITR 중 하나 또는 둘 모두의 ITR은 절두형(truncated)일 수 있다. 예를 들어, D 서열의 결실 및 말단 분리 부위(terminal resolution site; trs) 결실을 함유하는 절두형 5' ITR이 예를 들어 자기 상보성 AAV용으로 사용될 수 있다. 일 실시 양태에서, rAAV는 위형이며(pseudotyed), 즉, AAV 캡시드는 ITR을 제공하는 AAV와는 상이한 소스(source) AAV로부터 유래된다. 일 실시 양태에서, AAV 혈청형 2형의 ITR이 사용된다. 그러나, 다른 적합한 소스 유래의 ITR이 선택될 수 있다.

[0021] 본원에 기술된 바와 같이, 본원에 기술된 병태 중 1가지를 앓고 있는 환자에게는 세포에 있어서 기능성 인간 α-L-이두로니다아제 효소의 발현을 유도하는 조절 서열의 제어 하의 기능성 인간 α-L-이두로니다아제(hIDUA) 유

전자를 갖는 발현 카세트가 전달된다.

[0022] 본 발현 카세트는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 함유한다. 본 발명자에 의해 개발된 이 서열은 서열 번호 2의 서열을 코딩하는 젠뱅크(Genbank) NP000194.2의 공개된 유전자 서열과의 동일성이 약 83%이다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 80% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 hIDUA 유전자를 함유하며, 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩한다. 또 다른 실시 양태에서, 이 서열은 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 85% 이상 동일하거나 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 90% 이상 동일하며, 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩한다. 일 실시 양태에서, 이 서열은 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일하거나, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 97% 이상 동일하거나, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 99% 이상 동일하며, 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩한다. 일 실시 양태에서, 이것은 서열 번호 1의 약 1 내지 약 78에 상응하는 인간 α-L-이두로니다아제 (즉, 서열 번호 2의 대략 아미노산 26, 또는 대략 아미노산 27에서 대략 아미노산 653까지를 코딩함)의 리더 펩티드 서열을 포함하는 전장 hIDUA 유전자를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, hIDUA 유전자는 기능성 α-L-이두로니다아제 효소의 분비 부분에 융합된 이종성 리더 서열을 포함하는 합성 펩티드인 기능성 합성 인간 α-L-이두로니다아제 효소, 즉, 서열 번호 2의 대략 아미노산 27 내지 대략 아미노산 653 또는 이의 기능성 변이체 - 이는 본원에서 확인됨 - 중 1가지를 코딩한다.

[0023] 본원에서 서열과 관련하여 동일성 또는 유사성은, 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하도록 서열들을 정렬하고, 필요할 경우 갭(gap)을 도입한 후, 본원에 제공된 펩티드 및 폴리펩티드 영역과 동일하거나 (즉, 동일한 잔기) 유사한(즉, 공통 측쇄 특성을 기반으로 하여 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기, 하기 참조), 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 동일성 퍼센트 (%)는 두 폴리뉴클레오티드 또는 두 폴리펩티드 사이의 관계의 척도이며, 이는 각각 이들의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 비교함으로써 결정되는 바와 같다. 일반적으로, 비교될 두 서열은 상기 서열들 사이의 최대 상관성을 제공하도록 정렬된다. 두 서열의 정렬을 조사하고, 상기 두 서열 사이의 정확한 아미노산 또는 뉴클레오티드 관련성을 제공하는 위치의 수를 결정하고, 이를 전체 정렬 길이로 나누고, 이것에 100을 곱하여 동일성 % 수치를 제공한다. 이러한 동일성 % 수치는 비교될 서열들의 전 길이에 걸쳐 - 이는 동일하거나 매우 유사한 길이의, 그리고 고도로 상동성인 서열에 특히 적합함 - 또는 더 짧은 규정된 길이에 걸쳐 - 이는 동일하지 않은 길이의 서열 또는 더 낮은 수준의 상동성을 갖는 서열에 더 적합함 - 결정될 수 있다. 정렬 및 동일성 퍼센트의 수행을 위하여 문헌에서 및/또는 공개적으로 또는 상업적으로 이용가능한, 이용이 가능한 다수의 알고리즘 및 이를 기반으로 하는 컴퓨터 프로그램이 있다. 상기 알고리즘 또는 프로그램의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0024] 적합한 정렬 프로그램의 예는 예를 들어 유닉스(Unix) 하의 그리고 이후에 바이오에디트(Bioedit) 프로그램으로 임포트되는(imported) 소프트웨어 CLUSTALW (문헌[Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98]); 위스콘신 서열 분석 패키지(Wisconsin Sequence Analysis Package), 버전(version) 9.1 (문헌[Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984], 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)으로부터 입수가능함)를 포함한다. BESTFIT 및 GAP 프로그램을 이용하여 두 폴리뉴클레오티드 사이의 동일성 % 및 두 폴리펩티드 서열 사이의 동일성 %를 결정할 수 있다.

[0025] 서열들 사이의 동일성 및/또는 유사성의 결정을 위한 다른 프로그램은 예를 들어 미국 메릴랜드주 베데스다 소재의 미국 국립 생물 공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information; NCB)로부터 입수가능한, 그리고 NCBI의 홈페이지 www.ncbi.nlm.nih.gov를 통하여 접근가능한 BLAST 패밀리의 프로그램, GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)을 포함한다. 아미노산 서열들의 비교를 위하여 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티(penalty), 및 4의 갭 페널티가 이용될 수 있으며; FASTA (문헌[Pearson W. R. and Lipman D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988], 위스콘신 서열 분석 패키지의 일부로서 입수가능함)가 이용될 수 있다. SeqWeb 소프트웨어 (GCG 위스콘신 패키지로의 웹 기반의 인터페이스: Gap 프로그램).

[0026] 본 명세서 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용되는 바와 같이, "포함하는" 및 "포함하고 있는"이라는 용어는 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 포함한다. 역으로, "이루어진"이라는 용어 및 그의 변이형은 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 배제한다. "약"이라는 용어는 달리 특정되지 않으면 ±10%를 포함하여 ±10% 내의 변동을 포함한다.

[0027] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 인간 간 유도된 발현용으로 설계된다. 따라서, 간 특이적 프로모터가 본 발현

카세트에 특히 적합하다. 일 실시 양태에서, 티록신 결합 글로불린 프로모터가 선택된다. 일 실시 양태에서, TBG 프로모터는 도 1의 뉴클레오티드 442 내지 901의 서열을 갖는다. 대안적으로, 또 다른 간 특이적 프로모터가 선택될 수 있다. 특히, 조직 특이적인 프로모터의 예가 간 및 다른 조직에 대하여 공지되어 있다 (알부민, 문헌[Miyatake et al., (1997) J. Virol, 71:5124-32]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, 문헌[Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9]; 알파-태아단백질(AFP), 문헌[Arbuthnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14]), 뼈 오스테오칼신 (문헌[Stein et al., (1997) Mol. Biol. Rep., 24:185-96]); 뼈 시알로단백질 (문헌[Chen et al., (1996) J. Bone Miner. Res., 11:654-64]), 림프구 (CD2, 문헌[Hansal et al., (1998) J. Immunol, 161: 1063-8]; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런 특이적 엔올라아제(neuron-specific enolase; NSE) 프로모터와 같은 뉴런 프로모터 (문헌[Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol, 13:503-15]), 신경필라멘트 경쇄 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5]), 및 뉴런 특이적 vgf 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84]). 다른 프로모터 (간 특이적이 아닌 것)가 선택될 수 있지만, 이를 함유하는 발현 카세트는 TBG 또는 또 다른 간 특이적 프로모터를 포함하는 것의 이점 전부를 갖는 것이 아닐 수 있다. 대안적으로, 조절가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 국제 특허 공개 WO 2011/126808B2호를 참조한다.

[0028] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 1개 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 2개 이상의 발현 인핸서를 함유한다. 이들 인핸서는 동일할 수 있거나 서로와는 상이한 것일 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서를 포함할 수 있다. 이 인핸서는 2개의 카피(copy)로 존재할 수 있으며, 상기 두 카피는 서로에게 인접하여 위치한다. 대안적으로, 상기 인핸서의 이중 카피는 1개 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 발현 카세트는 인트론, 예를 들어 프로메가(Promega) 인트론을 추가로 함유한다. 다른 적합한 인트론은 당업계에 공지된 것, 예를 들어 국제 특허 공개 WO 2011/126808호에 기술된 것을 포함한다.

[0029] 또한, 본 발명의 발현 카세트에는 적합한 폴리아데닐화 시그널이 제공되어 있다. 일 실시 양태에서, 폴리A 서열은 토끼 글로빈 폴리 A이다. 일 실시 양태에서, 폴리A 서열은 도 1의 뉴클레오티드 3261-3387의 것을 특징으로 한다. 대안적으로, 또 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(human growth hormone; hGH) 폴리아데닐화 서열, SV40 폴리A, 또는 합성 폴리A. 또 다른 통상적인 조절 요소가 발현 카세트 내에 추가로 또는 선택적으로 포함될 수 있다.

[0030] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 벡터 상에 엔지니어링된다(engineered). 선택적으로, 본 발명의 조성물은 변형 인간 IDUA 유전자를 포함하는 제1 발현 카세트 및 상이한 유전자를 포함하는 제2 발현 카세트를 함유할 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, 기능성 인간 IDUA는 1가지 초과의 발현 카세트로부터 발현될 수 있는데, 이는 예를 들어 국제 특허 공개 WO 2011/126808호에 기술된 바와 같이 다수의 벡터 상에 위치할 수 있다.

[0031] 일 실시 양태에서, 발현 카세트는 pENN.TBG.hIDUA.nRBG가 지니고 있는데, 상기 플라스미드는 발현 카세트를 지니고 있는 재조합 아데노 연관 바이러스의 생성에 사용된다.

[0032] AAV 바이러스 입자의 생성

[0033] 일 실시 양태에서, 본 발명은 AAV 캡시드를 갖고, 상기 캡시드 내에 패키징된 5' 반전 말단 반복부(ITR), 발현을 제어하는 조절 서열의 제어 하의 인간 α-L-이두로니다아제(hIDUA) 유전자 및 AAV 3' ITR을 갖는 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV) 입자를 제공하며, 여기서, 상기 hIDUA 유전자는 서열 번호 1로 나타낸 서열 (도 1), 또는 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩하는, 서열 번호 1의 서열에 대하여 약 95% 이상 동일한 서열을 갖는다. 1가지의 특히 바람직한 rAAV로는 AAV2/8.TBG.hIDUA.co가 있다.

[0034] AAV 기반의 벡터의 제조 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 제2007/0036760호 (2007년 2월 15일)를 참조한다. AAV8의 AAV 캡시드의 사용이 본원에 기술된 조성물 및 방법에 특히 적합하다. AAV8의 서열 및 AAV8 캡시드를 기반으로 한 벡터의 생성 방법이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호, 및 미국 특허 제8,318,480호에 기술되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 또한 적합한 것은 AAV9 캡시드이다. AAV9의 서열 및 AAV9 캡시드를 기반으로 한 벡터의 생성 방법이 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,906,111호에 기술되어 있다. 그러나, 다른 AAV 캡시드가 본 발명에서 사용하기 위해 선택되거나 생성될 수 있다. 다수의 그러한 AAV의 서열이 상기에 인용된 미국 특허 제7,282,199 B2호, 미국 특허 제7,790,449호, 미국 특허 제8,318,480호, 및 미국 특허 제7,906,111호에 제공되어 있고/있거나 젠뱅크로부터 입수가능하다. AAV 캡시드 중 임의의 것의 서열은 합성에 의해 또는 다양한 분자 생물학 및 유

전 공학 기술을 이용하여 쉽게 생성될 수 있다. 적합한 생성 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY)]을 참조한다. 대안적으로, 펩티드 (예를 들어, CDR)를 코딩하는 올리고뉴클레오티드 또는 펩티드 그 자체가 합성에 의해, 예를 들어, 공지된 고체상 펩티드 합성법에 의해 생성될 수 있다 (문헌[Merrifield, (1962) J. Am. Chem. Soc, 85:2149]; 문헌[Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62]). 또한, 문헌[D M McCarty et al., "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254]을 참조한다. 자기 상보성 AAV가 예를 들어 미국 특허 제6,596,535호; 미국 특허 제7,125,717호; 및 미국 특허 제7,456,683호에 기술되어 있는데, 상기 미국 특허 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 이러한 생성 방법 및 다른 적합한 생성 방법은 당업자의 지식 이내이며, 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0035] 본원에 기술된 재조합 아데노 연관 바이러스(AAV)는 공지된 기술을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소한, AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 트랜스진(transgene)으로 구성된 발현 카세트; 및 발현 카세트가 AAV 캡시드 단백질 내로 패키징되는 것을 가능케 하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0036] AAV 캡시드 내에 AAV 발현 카세트를 패키징하기 위하여 숙주 세포에서 배양되는 데 필요한 구성요소는 트랜스로(in trans) 숙주 세포에게 제공될 수 있다. 대안적으로, 임의의 1가지 이상의 필요한 구성요소 (예를 들어, 발현 카세트, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능)가 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 상기 필요한 구성요소 중 1가지 이상을 함유하도록 엔지니어링된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 그러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하의 상기 필요한 구성요소(들)를 함유한다. 그러나, 상기 필요한 구성요소(들)는 구성적 프로모터(constitutive promoter)의 제어 하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 구성적 프로모터의 예가 본원에서 트랜스진과 함께 사용하기에 적합한 조절 요소의 논의에 제공되어 있다. 또 다른 대안에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 구성적 프로모터의 제어 하의 선택된 구성요소(들) 및 1개 이상의 유도성 프로모터의 제어 하의 다른 선택된 구성요소(들)를 함유할 수 있다. 예를 들어, 293 세포 (이는 구성적 프로모터의 제어 하의 E1 헬퍼 기능을 함유함)로부터 유래되지만 유도성 프로모터의 제어 하의 rep 단백질 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 또 다른 안정한 숙주 세포가 당업자에 의해 생성될 수 있다.

[0037] 본 발명의 rAAV의 생성에 필요한 발현 카세트, rep 서열, cap 서열 및 헬퍼 기능은, 보유한 서열들을 이전시키는 임의의 유전 요소의 형태로 패키징 숙주 세포에 전달될 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기술된 것을 비롯한 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시 양태의 제작에 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 숙련자에게 공지되어 있으며, 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다. 이와 유사하게, rAAV 비리온의 생성 방법은 공지되어 있으며, 적합한 방법의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다. 예를 들어, 문헌[K. Fisher et al., (1993) J. Virol, 70:520-532] 및 미국 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0038] 달리 특정되지 않으면, AAV ITR, 및 본원에 기술된 다른 선택된 AAV 구성요소는 임의의 AAV 중에서 쉽게 선택될 수 있다. 이러한 ITR 또는 다른 AAV 구성요소는 당업자가 이용가능한 기술을 이용하여 AAV 서열로부터 쉽게 단리될 수 있다. 그러한 AAV는 학술적 소스, 상업적 소스 또는 공공적 소스(예를 들어, 미국 버지니아주 머내서스 소재의 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection))로부터 단리되거나 수득될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌에서 또는 예를 들어 젠뱅크®, 펍메드(PubMed)® 등과 같은 데이터베이스에서 입수가능한 바와 같은 공개된 서열을 참고하여 합성 수단 또는 다른 적합한 수단을 통하여 수득될 수 있다.

[0039] A. 발현 카세트

[0040] 발현 카세트는 본원에서 정의된 바와 같다. 게다가, 본원에 기술된 발현 카세트 및/또는 벡터는 추가의 트랜스진 또는 조절 서열을 함유할 수 있다. 발현 카세트는 캡시드 단백질 내에 패키징되며, 선택된 숙주 세포에 전달된다.

[0041] 1. 트랜스진

[0042] 본 발명은 다수의 트랜스진의 사용을 포함할 수 있다. 적합한 트랜스진은 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다.

트랜스진의 선택은 본 발명을 한정하는 것으로 간주되지 않는다.

[0043] 2. 조절 요소

[0044] 발현 카세트에 대하여 상기에 확인된 주요 요소에 더하여, 벡터는 본 발명에 의해 생성된 바이러스로 감염되거나 플라스미드 벡터로 형질감염된 세포에서 트랜스진의 전사, 번역 및/또는 발현을 가능케 하는 방식으로 트랜스진에 작동가능하게 연결된 통상적인 제어 요소를 또한 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열은 관심대상의 유전자와 연접한 발현 제어 서열 및 관심대상의 유전자를 제어하기 위하여 트랜스로 작용하거나 소정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시 서열, 종결 서열, 프로모터 서열 및 인핸서 서열을 포함하며, 효율적인 RNA 프로세싱(processing) 시그널, 예컨대 스플라이싱(splicing) 및 폴리아데닐화 (폴리A) 시그널; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열 (즉, 코작(Kozak) 콘센서스(consensus) 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 요구될 경우, 코딩된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연 프로모터, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 및/또는 조직 특이적 프로모터인 프로모터를 비롯한 다수의 발현 제어 서열이 당업계에 공지되어 있으며, 이용될 수 있다.

[0045] 구성적 프로모터의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus; RSV) LTR 프로모터 (선택적으로, RSV 인핸서를 포함함), 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터 (선택적으로, CMV 인핸서를 포함함) (예를 들어, 문헌[Boshart et al., (1985) Cell, 41:521-530] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타아제 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나아제(phosphoglycerol kinase; PGK) 프로모터, 및 EF 1 프로모터 [인비트로겐(Invitrogen)]를 포함한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하며, 외부에서 공급된 화합물, 환경 인자, 예컨대 온도, 또는 특정한 생리학적 상태, 예를 들어 급성기의 존재, 세포의 특정한 분화 상태에 의해, 또는 단지 복제 세포에서 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 제한 없이, 인비트로겐, 클론테크(Clontech) 및 아리어드(Ariad)를 비롯한 다양한 상업적 공급처로부터 입수가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되었으며, 이는 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 외부에서 공급된 화합물에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연 유도성 양 메탈로티오닌(metallothionine; MT) 프로모터, 덱사메타손(Dex) 유도성 생쥐 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus; MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터 시스템 [국제 특허 공개 WO 98/10088호]; 엑디손 곤충 프로모터 (문헌[No et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351]), 테트라사이클린 억제성(tetracycline-repressible) 시스템 (문헌[Gossen et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551]), 테트라사이클린 유도성 시스템 (문헌[Gossen et al., (1995) Science, 268:1766-1769], 또한 문헌[Harvey et al., (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518] 참조), RU486 유도성 시스템 (문헌[Wang et al., (1997) Nat. Biotech., 15:239-243] 및 문헌[Wang et al., (1997) Gene Ther., 4:432- 441]) 및 예를 들어 아리어드로부터 입수가능한 아르젠트(Argent)™ 시스템을 포함하는 라파마이신 유도성 시스템 (문헌[Magari et al., (1997) J. Clin. Invest., 100:2865-2872])을 포함한다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 다른 유형의 유도성 프로모터로는 특정한 생리학적 상태, 예를 들어 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해, 또는 단지 복제 세포에서 조절되는 것이 있다.

[0046] 트랜스진의 또 다른 실시 양태는 조직 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함한다. 예를 들어, 골격근에서의 발현이 요구될 경우, 근육에서 활성을 갖는 프로모터가 사용되어야 한다. 이는 골격 β-액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀(dystrophin), 데스민, MHC, 근육 크레아틴 키나아제를 코딩하는 유전자 유래의 프로모터와, 천연 발생 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다 (문헌[Li et al., (1999) Nat. Biotech., 17:241-245] 참조). 조직 특이적인 프로모터의 예가 CNS/뉴런에 대하여 공지되어 있으며, 이는 특히 예를 들어 뉴런 특이적 엔올라아제(neuron-specific enolase; NSE) 프로모터 (문헌[Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol, 13:503-15]), 신경필라멘트 경쇄 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5]), 및 뉴런 특이적 vgf 유전자 (문헌[Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84])를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 트랜스진에 대한 천연 프로모터가 사용된다. 천연 프로모터는, 트랜스진의 발현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요구될 때 바람직할 수 있다. 트랜스진의 발현이 일시적으로 또는 발생학적으로(developmentally), 또는 조직 특이적인 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 할 때 천연 프로모터가 사용될 수 있다. 추가의 실시 양태에서, 다른 천연 발현 제어 요소, 예컨대 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작 콘센서스 서열이 천연 발현의 모방에 또한 사용될 수 있다.

[0047] 본원에서 참고의 용이함을 위하여 트랜스진, 프로모터/인핸서 및 5' 및 3' AAV ITR의 조합이 발현 카세트로 지칭된다. 본 발명의 교시가 제공되면, 그러한 발현 카세트의 설계는 통상적인 기술에 의지해서 이루어질 수

있다.

[0048] 3. 발현 카세트의 AAV 패키징 숙주 세포로의 전달

[0049] 발현 카세트는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 상에 지녀질 수 있으며, 이는 숙주 세포로 전달된다. 본 발명에서 유용한 플라스미드는 플라스미드가 복제, 및 선택적으로, 원핵 세포, 포유류 세포 또는 이들 둘 모두에서의 통합에 적합하도록 엔지니어링될 수 있다. 이러한 플라스미드 (또는 발현 카세트를 갖고 있는 다른 벡터)는 진핵생물 및/또는 원핵생물에서의 발현 카세트의 복제를 가능케 하는 서열 및 이들 시스템에 대한 선발 마커를 함유한다. 선발가능한 마커 또는 리포터(reporter) 유전자는 특히 카나마이신, 제네티신, 하이그로마이신 또는 퓨리마이신 내성을 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 또한 플라스미드는 암피실린 내성과 같이 박테리아 세포에서 그 벡터의 존재를 시그널링하는 데 사용될 수 있는 특정한 선발가능 리포터 또는 마커 유전자를 함유할 수 있다. 플라스미드의 다른 구성요소는 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스 핵 항원을 이용하는 앰플리콘(amplicon) 시스템과 같이, 복제 원점 및 앰플리콘을 포함할 수 있다. 이러한 앰플리콘 시스템, 또는 다른 유사한 앰플리콘 구성요소는 세포에서 고 카피 에피솜 복제를 가능케 한다. 바람직하게는, 발현 카세트를 갖고 있는 분자로 세포를 형질감염시키는데, 여기서 이것은 일시적으로 존재할 수 있다. 대안적으로, 발현 카세트는 염색체로, 또는 에피솜으로서, 숙주 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 특정 실시 양태에서, 발현 카세트는 다수의 카피로, 선택적으로 헤드투헤드(head-to-head), 헤드투테일(head-to-tail) 또는 테일투테일(tail-to-tail) 콘카타머(concatamer)로 존재할 수 있다. 적합한 형질감염 기술은 공지되어 있으며, 발현 카세트를 숙주 세포로 전달하는 데 쉽게 이용될 수 있다.

[0050] 일반적으로, 발현 카세트를 포함하는 벡터를 형질감염에 의해 전달할 때, 벡터는 약 5 ㎍ 내지 약 100 ㎍의 DNA, 약 10 ㎍ 내지 약 50 ㎍의 DNA에서 약 1 x 10^4개의 세포 내지 약 1 x 10^{13}개의 세포, 또는 약 1 x 10^5개의 세포까지의 양으로 전달된다. 그러나, 숙주 세포에 대한 벡터 DNA의 상대적인 양은, 선택된 벡터, 전달 방법 및 선택된 숙주 세포와 같은 요인을 고려하여 조정될 수 있다.

[0051] B. 패키징 숙주 세포

[0052] 발현 카세트에 더하여, 숙주 세포는 숙주 세포에서의 본 발명의 AAV 캡시드 단백질의 발현을 유도하는 서열 및 발현 카세트에서 발견되는 AAV ITR의 소스와 동일한 소스, 또는 교차 상보 소스의 rep 서열을 함유한다. 또한 패키징 숙주 세포는 본 발명의 rAAV를 패키징하기 위하여 헬퍼 기능을 필요로 한다. 그러한 헬퍼 기능은 당업계에 공지되어 있으며, 본원에서 중복되지 않는다. 이와 유사하게, AAV 캡시드를 갖는 적합한 벡터의 제조 방법이 공지되어 있다 [예를 들어, 미국 특허 공개 제2007/0036760호 참조].

[0053] 본원에 기술된 상기 발현 카세트를 코딩하는 rAAV의 구성물은 생리학적 상용성 담체 중에 현탁될 수 있고, 대상체에게 투여될 수 있다. 일 실시 양태에서, 담체는 살균 염수 단독이거나, 선택적으로, 임의의 다수의 완충액(예를 들어, 인산염 완충 염수)을 포함한다. 다른 예시적인 담체는 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 덱스트란, 한천, 펙틴, 참깨유, 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0054] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 rAAV 및 담체(들)에 더하여, 다른 통상적인 제약 성분, 예컨대 보존제 또는 화학 안정제를 함유할 수 있다. 일 실시 양태에서, 전달은 정맥내 전달을 통한 것이다. 그러나, 또 다른 투여 경로가 선택될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 투여 경로는 요구될 경우 조합될 수 있다.

[0055] 일 실시 양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 rAAV를 함유하는 동결건조된 조성물, 또는 동결건조된 형태의 rAAV의 혼합물을 포함한다. 선택적으로, 1가지 이상의 안정제 또는 보존제가 이 조성물에 존재한다. 적합하게는, 사용을 위하여, 동결건조된 조성물은 적합한 희석제, 예를 들어 살균 염수 또는 완충 염수로 재구성된다.

[0056] 바이러스 벡터의 투여량은 주로 치료되는 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 요인에 의존하며, 따라서 환자들 간에 달라질 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료적 유효 투여량은 일반적으로, 수성 현탁제 1 mL당 약 3 x 10^9 내지 3 x 10^{13}개의 게놈의 농도의 바이러스 벡터 (입자)를 함유하는 용액 약 0.1 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 0.1 mL 내지 약 10 mL, 또는 약 0.1 mL 내지 약 5 mL, 또는 약 0.5 mL 내지 약 1 mL의 범위이다. 또 다른 예시적인 투여량으로는 1 kg당 약 3 x 10^9 내지 3 x 10^{13}개의 AAV 게놈이 있다. 1가지의 적합한 체적으로는 약 1 mL이 있다. 또 다른 실시 양태에서, rAAV 구성물의 치료적 유효 용량은 70 kg의 동물당 약 0.001 ng 내지 약 1000 mg의 범위이며, 이는 단회 투여량으로 또는 일련의 2회 이상의 투약에 걸쳐 전달될 수 있다. 다른 적합한 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 치료 효과와 임의의 부작용과의 밸런스를 맞추기 위하여 조정되며, 그러한 투여량은 재조합 벡터가 이용되는 치료적 응용에 따라 달라질 수 있다.

[0057] 치료 방법

[0058] 본 발명의 조성물은 국소 및 전신 감염과 같은 평생 말초 접근의 합병증 뿐만 아니라 경도 내지 말기 아나필락시스의 범위일 수 있는, 재조합 효소에 대한 면역 반응과 관련된 효소 대체 요법의 합병증을 회피한다. 또한, ERT와는 대조적으로, 본 발명의 조성물은 장기간의 반복된 매주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 의해 구애되고자 함이 없이, 본원에 기술된 간 지향성 치료법(liver-directed therapeutic method)은 높은 형질도입 효율을 갖는 벡터에 의해 제공되는 효율적인 장기간의 유전자 전달을 제공함으로써 MPSI 질환과 연관된 중추신경계 표현형을 바로잡는 데 유용한 것으로 생각되는데, 이는 혈액 뇌 장벽을 가로질러 치료적 영향력을 제공하는 계속적인 상승된 순환 IDUA 수준을 제공할 수 있다. 게다가, AAV 간 유전자 전달은 상기 효소에 대하여 활성 관용을 제공하고 항체 형성을 방지할 수 있다.

[0059] 본원에 기술된 변형 hIDUA 발현 카세트의 치료적 유효량을 전달하는 단계를 포함하는 제I형 점액다당류증의 치료 방법이 제공된다. 또한, 헐러 증후군, 헐러-샤이에 증후군 및 샤이에 증후군의 증상의 치료 및/또는 개선 방법이 제공된다.

[0060] 일 실시 양태에서, rAAV는 정맥내로 전달된다.

[0061] 또 다른 실시 양태에서, rAAV는 약 3 x 10^{9} 내지 약 3 x 10^{12}이 대상체에게 전달되는 양으로 전달된다. rAAV의 단회 투여가 효과적인 것으로 예상되지만, 간은 재생성 기관이기 때문에, 투여는 반복된다 (예를 들어, 연 4회, 연 2회, 연 1회, 또는 달리 필요할 경우). 선택적으로, 치료적 유효량의 처음 용량은 대상체의 연령 및 주입 용인 능력을 고려하여 분할 주입 기간에 걸쳐 전달될 수 있다. 그러나, 전체 치료 용량의 반복된 매주 주사는 필요하지 않으며, 이는 편안함 및 치료 결과 둘 모두의 면에서 환자에게 이점을 제공한다.

[0062] 하기 실시예는 단지 예시적인 것으로서, 본원에 기술된 본 발명을 한정하는 것이 아니다.

[0063] 실시예 1 - 트랜스진 및 벡터의 생성

[0064] 기능성 인간 α-L-이두로니다아제를 코딩하는 변형 뉴클레오티드 서열을 합성하였다. 생성된 서열은 인간 발현에 특히 적합하며, 기능성 인간 IDUA 유전자 (hIDUA; 젠뱅크 NP000194.2)에 대한 동일성이 약 90% 미만이다. 그 후, 생성된 트랜스진을 엔지니어링된 MluI 및 SalI 부위를 이용하여 유펜 벡터 코어(UPenn Vector Core)로부터 입수가능한 AAV 벡터로의 패키징에 필요한 시스(cis) 요소를 함유하는 플라스미드 내에 삽입시켰다. 유전자 발현을 인간 갑상선 결합 글로불린(TBG, 문헌[Hayashi Y, Mori Y, Janssen OE, et al. Human thyroxine-binding globulin gene: complete sequence and transcriptional regulation. Mol Endocrinol 1993; 7: 1049-1060])에 의해 유도하였다. 도 2에 예시한 생성된 플라스미드, pENN.AAV.TBG.PI.hIDUA.nRBG는 간 특이적 TBG 프로모터를 포함하는 발현 제어 서열의 제어 하의 변형 hIDUA 유전자를 함유한다. 이 플라스미드는 AAV2 5' ITR, 알파 mic/bic 인핸서의 탠덤(tandem) 반복부, TBG 프로모터, 프로메가 인트론 서열, 서열 번호 1의 변형 인간 IDUA 유전자, 토끼 글로빈 폴리 A, 및 AAV2 - 3' ITR을 추가로 함유한다.

[0065] 본질적으로 문헌[Lock et al., Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. Hum Gene Ther 21(10): 1259-1271. (2010)]에 기술된 바와 같이 대규모 벡터 제조를 행하였다. PEI 기반의 형질감염을 HEK293 세포의 75% 융합 단층을 함유하는 10개 층 세포 적층체에서 수행하였다. 상기 세포 적층체로부터의 공급원료 배양 배지 10 L를 청징시키고, 그 후 접선 유동 여과(tangential flow filtration)에 의해 농축시켰다. 상기 농축 청징 공급원료를 요오딕사놀 (옵티프렙(Optiprep); 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 케미칼 컴퍼니(Sigma Chemical Co.)) 구배로 정제하였다. 가시적 오염 단백질 밴드 바로 아래의 모든 분획물을 수집하고 풀링하였다(pooled). 풀링된 분획물을 PBS/35 mM NaCl에 대하여 투석여과하고, 아미콘 울트라(Amicon Ultra) 15 스핀 농축기 (밀리포어(Millipore))를 사용하여 농축시켰다. 글리세롤을 상기 투석여과 농축 생성물에 최종 5%가 되도록 첨가하고, 상기 제제를 분취하고, -80℃에서 보관하였다. 생성된 벡터를 본원에서 AAV8.TBG.hIDUA 또는 AAV2/8.TBG.hIDUA로 칭한다. 특정 위치에서, 재조합 AAV 입자를 AAV8.TBG.hIDUAco 또는 AAV2/8.TBG.hIDUAco로 지칭한다. 상기 플라스미드는 AAV2 5' ITR, 알파 mic/bic 인핸서의 탠덤 반복부, TBG 프로모터, 프로메가 인트론 서열, 서열 번호 1의 변형 인간 IDUA 유전자, 토끼 글로빈 폴리 A, 및 AAV2 - 3' ITR을 추가로 함유한다.

[0066] 실시예 2 -

[0067] A. 세포 기반 검정법

[0068] HEK 293 세포는 5% 소 태아 혈청(FBS; XXX), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (p/s: 라이프 테크놀로지즈(Life

Technologies)™)을 포함하는 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; 깁코(Gibco)®, 라이프 테크놀로지즈™)를 함유하는 성장 배지에서 유지시켰다. 제조업자의 권고에 따라 리포펙타민(Lipofectamine)™ 2000 (인비트로겐™, 라이프 테크놀로지즈™)을 사용하여 플라스미드 DNA 형질감염을 실시하였다. 간략하게는, 세포를 형질감염용 배지 (DMEM + 5% FBS, p/s 없음)에서 6웰 조직 배양 디쉬(dish)에서 5 x 10^5개의 세포/웰의 밀도로 도말하고, 5% CO_2에서 37° 에서 하룻밤 부착시켰다. 그 다음날에, 세포를 90 내지 95% 융합도에 대하여 점검하고, 배지를 새롭게 하였다. 플라스미드 DNA 및 리포펙타민™ 2000을 1:2.5 (DNA:리포펙타민™ 2000)의 최종 비를 위하여 옵티-MEM(Opti-MEM) I® 혈청 감소 배지 (혈청을 포함하지 않음)로 희석시켰다. 리포펙타민™ 2000 형질감염용 용액을 22℃에서 5분 동안 인큐베이션한 후 상기 DNA 용액과 혼합하였다. 상기 DNA:리포펙타민™ 2000 용액을 함유하는 이러한 최종 형질감염 혼합물을 추가로 20분 동안 (22℃) 인큐베이션한 후 세포 및 배지를 포함하는 웰에 첨가하였다. 모의 세포(mock cell)는 플라스미드 DNA를 받지 않았으며, eGFP를 코딩하는 플라스미드를 형질감염 대조구로서 사용하였다. 시험한 각각의 구성물에 대하여 3개의 웰을 형질감염시켰다. 세포를 5% CO_2에서 37° 에서 인큐베이션하고, 4시간 후에 배지를 성장 배지로 교체하였다. 각각의 웰의 내용물을 72시간 후에 수확하고, 4℃에서 4000 rpm에서 15분 동안 수집하였다. 세포를 웰당 100 ㎕의 용해 완충액 (0.2%의 트리톤(Triton) X-100, 0.9% NaCl, pH4.0)에 재현탁시키고, 와동시키면서 3회 냉동/해동시켰다. 게다가, 용해물을 37℃에서 30분 동안 벤조나아제(Benzonase)로 처리한 후 최종적으로 냉동/해동시켰다. 세포 잔사를 10 000 rpm (4℃)에서 10분 동안 펠렛화하고(pelleted), 최종 청징 세포 용해물을 얼음 상에 두고, 효소 활성에 대하여 즉시 검정하였다.

[0069] B. 조직 용해 및 단백질 추출

[0070] 냉동된 조직을 드라이아이스 베드(bed) 상의 박스에서 반해동시키고(semi-thawed), 습성 조직의 작은 조각을 작은 페트리 디쉬(petri dish)에서 절단하였다 (대략 20 mg, 대략 10 mg의 비장). 그 후, 상기 사전 프로세싱된 (pre-processed) 조직을 5 mm 강철 비드 및 1 ml 용해 완충액 (0.2% 트리톤 X-100, 0.9% NaCl, pH 4.0)을 이용하여 2 ml 에펜도르프(eppendorph)에서 함침시켰다. 샘플을 조직 분쇄기(tissue-lyzer)에서 30 Hz에서 2분 동안 균질화하였다. 균질화된 샘플을 6000 rpm에서 30초 동안 잠시 스핀시키고, 5 mm 강철 비드를 제거하였다. 조직 용해물을 추가로 1-1/16" 직경의 마이크로혼(microhorn)을 사용하여 초음파 처리함으로써 파쇄시키고 -80℃에서 하룻밤 냉동시켰다. 프로세싱된 샘플을 그 다음날에 22℃에서 해동시키고, 원심분리 (10 000 rpm/10분/4℃)에 의해 청징시켰다. 부유성의 뇌 유래 지질 층, 또는 기타 지방 조직을 검정 전에 흡인하였다. 그 후 샘플을 습성 얼음 상에서 보관하고, 효소 활성에 대하여 즉시 검정하였다.

[0071] C. 단백질 평가

[0072] 전체 단백질을 제조업자의 프로토콜에 따라 쿠마시 기반의 브래드포드 검정법(Coomassie based Bradford assay; 서모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 이용하여 평가하였다. 간략하게는, 1 내지 25 ㎍/ml의 작동 범위(working range)를 생성하는 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA), 및 BSA를 포함하지 않는 단백질 희석 완충액을 설명하는 블랭크(blank)를 사용하여 표준 곡선을 셋업하였다(set up). 샘플을 1/300 내지 1/1200으로 2배 희석시키고, 96웰 편평 바닥 디쉬에서 1:1의 희석 단백질:브래드포드 시약의 비로 혼합하였다. 샘플을 22℃에서 15분 동안 평형시키고, 흡광도 값을 595 nm의 제안된 파장에서 플레이트 판독기에 수집하였다. 원시 값은 블랭크 보정을 이용하여 표준 곡선을 사용하여 ㎍/ml 농도로 환산하였다. 그 후, 마이크로그램의 양을 환산하여 밀리그램 단위로 보고하였다.

[0073] D. 효소 활성 검정

[0074] 이전에 공개된 방법 (문헌[Kakkis et al., Mol Genet Metab, 2001 Mar; 72(3): 199-208])에 따라 4-메틸움벨리페릴 알파-L-이도피라노시듀론산, 시클로헥실암모늄염 (4-MU-이도(Ido); 토론토 리서치 케미칼즈, 인크.(Toronto Research Chemicals, Inc.))을 기질로서 이용하여 IDUA 효소 활성을 검정하였다. 간략하게는, 5 내지 15 ㎕의 용해물, 또는 혈청을 이중 증류수(ddH_2O)를 이용하여 100 ㎕까지 되게 하고, 반응 완충액 (0.1 M 아세트산나트륨 - pH 3.5 - , 0.15 M NaCl, 0.05% 트리톤 X-100)으로 희석시킨 100 μM 4-MU-이도 기질 100 ㎕를 메틸아크릴레이트 큐벳 (서모 사이언티픽)에서 합하였다. 반응물을 37℃ 수조에서 1 내지 3시간 동안 인큐베이션하고, 1x 중지 완충액 (290 mM 글리신, 180 mM 탄산나트륨, pH 10.5)의 첨가에 의해 반응을 종료하였다. 생성물을 UV 채널 (흡광: 365 nm, 발광: 440 내지 470 nm)을 통하여 퀀티플루오르(QuantiFluor)™-ST (프로메가)에서 판독하였다. 원시 형광 값을 기록하고, 공지된 양의 4-메틸움벨리페론 (M-5410;

바이오신스(Biosynth)®)의 표준 곡선을 이용하여 nmol/ml/hr로 환산하였다. 세포 및 조직 용해물을 개산 단백질 값 (nmol/mg/hr; 표제가 "단백질의 평가"인 방법 섹션을 참조)으로 정규화하였다.

[0075] E. DNA 추출 및 게놈 카피 분석

[0076] 이배체 세포에서 벡터 DNA 로드를 결정하기 위하여 탁맨(Taqman) PCR을 이용하였다. 실시간 PCR에 의한 벡터 게놈의 검출 및 정량화를 위하여, 퀴아앰프 DNA 미니 키트(QIAamp DNA Mini Kit) (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 전체 세포 DNA를 조직으로부터 추출하였다. 프라이머 및 프로브 세트는 하기 서열을 이용하여 벡터의 nRBG 폴리A 영역을 표적화하도록 설계하였다: 정방향 프라이머: GCCAAAAATTATGGGGACAT, 역방향 프라이머: ATTCCAACACACTATTGCAATG, 프로브: 6FAM- ATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT-TAMRA. 벡터 게놈 정량화를 위한 표준 곡선을 상응하는 벡터의 생성에 사용한 시스 플라스미드를 이용하여 확립하였다. 주형으로서 200 ng의 전체 세포 DNA, 각각 300 nM의 프라이머 및 200 nM의 프로브를 포함하는 탁맨 범용 PCR 마스터 믹스(TaqMan Universal PCR Master Mix) (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 이용하여 PCR을 수행하였다. 사이클은 50℃, 2분; 95℃, 10분; 95℃, 15초, 40 사이클; 및 60℃, 1분이었다.

[0077] F. 면역블로팅(immunoblotting)

[0078] 표준 방법에 따라 면역블로팅을 수행하였다. 간략하게는, NuPAGE 겔 시스템 (라이프 테크놀로지즈), 4 내지 12% 비스-트리스 겔을 사용하였다. 20 V에서 30분 후에 PVDF 막으로 이전되었다. 블록은 T-PBS 중 10% NFDM이었다 (하룻밤). 일차 MAb는 1:300의 생쥐 항-인간 IDUA (1.5시간)이었음; T-PBS 중 1% NFDM. 이차: 1:3000의 HRP-결합 토끼 항-생쥐; T-PBS 중 1% NFDM. 검출은 수퍼시그널 웨스트 듀라 화학발광 기질(SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate) (서모 사이언티픽), x선 필름 상에서의 30초 노출에 의한 것이었다.

[0079] 실시예 3 - 생쥐 및 개에서의 생체내(in vivo) 연구

[0080] IDUA 결함을 개에서 발견할 수 있으며, 이는 대동물에서의 상기 질환 및 치료법의 연구를 허용한다. MPS I 개는 IDUA 유전자 내에 열성 (널(null)) 돌연변이를 갖고 있으며, 여기서, 인트론 1의 공여 스플라이스 부위(donor splice site)에서의 G>A 돌연변이는 엑손-인트론 접합부에서 조기 종결 코돈을 생성한다 (문헌[Menon, K.P., P.T. Tieu, and E.F. Neufeld, Architecture of the canine IDUA gene and mutation underlying canine mucopolysaccharidosis I. Genomics, 1992. 14(3): p. 763-8.]). 개에서의 질환 경과는 헐러-샤이에 증후군과 유사하며; 질병 소견은 흉부 변형을 포함하는 중대한 골격 질환을 포함한다.

[0081] 소변중 GAG의 분석은 임상 환경에서 MPS I의 치료제의 효능을 결정하는 데 사용되는 생화학적 마커이다.

[0082] 글리코사미노글리칸(GAG)의 축적을 파라핀 절편의 알시안 블루(Alcian Blue) (pH 1) 염색에 의해 주요 기관에서 평가하였다. 세포 내에서의 비프로세싱된 GAG의 축적은 톨루이딘 블루(Toluidine Blue)로 염색된 플라스틱 매립된 조직으로부터의 1 ㎛의 얇은 절편에서 특히 잘 가시화된다. 에폰 매립된 조직의 얇은 절편 (1 ㎛)을 톨루이딘 블루로 염색하였다. 이는 저장 물질을 함유하는 세포 ("포말 해면 세포")를 나타낸다.

[0083] 뇌에서 강글리오시드 GM3에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학적 방법을 수행하였다. 이는 뉴런에서의 GM3의 비정상적인 저장을 나타낸다. 피질을 개에서 평가하고 피질 및 시상하부를 생쥐에서 평가하였다. 간에서의 인간 IDUA의 발현을 면역형광에 의해 평가하였다.

[0084] A. 생쥐 연구

[0085] 실시예 1에 설명한 바와 같이 AAV8.TBG.modified hIDUA를 제조하였다. 생쥐 (약 3개월령)는 약 1 x 10^{11} GC, 3 x 10^{10} GC, 3 x 10^{9} GC, 1 x 10^{9} GC의 용량으로 정맥내 주사하고, 주사한지 대략 2주 후에 평가하였다.

[0086] 그 결과는, 1 x 10^{11}, 3 x 10^{10}, 및 3 x 10^{9}으로 투약한 동물에서 GAG 염색의 감소 또는 완전한 부재를 나타냈다. 이들 동물에서, 저장 병변의 감소 또는 완전한 부재가 얇은 절편에서 관찰되었다.

[0087] 1 x 10^{9}으로 투약된 동물에서 GAG 저장은 비처리 생쥐에서와 같이 다소 보이며 저장 병변이 비처리 생쥐에서와 같이 다소 보인다.

[0088] GM3 저장에 있어서, 1 x 10^{11} GC 및 3 x 10^{10} GC로 투약된 동물만을 평가하였으며, 뉴런에서의 GM3 저장의 매우

약한 개선이 관찰되었다.

[0089] IDUA의 강한 발현 (100%의 간세포)이 1 x 10^{11} GC로 투약된 동물에서 관찰되었다. 이는 더 낮은 용량에 의해 감소하며, 이때 단지 매우 약간의 양성 간세포가 1 x 10^{9} GC에서 보인다.

[0090] B. 개 연구

[0091] 실시예 1에서 설명한 바와 같이 AAV8.TBG.modified hIDUA를 제조하였다. 개 (약 8개월령)는 1 x 10^{11} GC의 용량으로 정맥내 주사하고, 주사 후 4개월 후에 (즉, 1년령) 평가하였다.

[0092] 이 연구는 저장 병변의 역전을 나타낸다. 더욱 특히는, 모든 주요 기관에서의 GAG 저장의 사실상 완전한 제거가 알시안 블루 염색에 의해 보여진다. 저장 병변은 심장, 신장 또는 간의 얇은 절편에서 전혀 관찰되지 않는다. GM3 축적의 감소 또는 완전한 제거가 뉴런에서 관찰된다. 간에서의 IDUA의 발현이 95% 초과의 간세포에서 면역형광에 의해 관찰된다.

[0093] 실시예 4 - AAV2/8.TBG.hIDUA를 이용한 헐러-샤이에의 치료

[0094] IDUA의 AAV8 매개 유전자 전달을 헐러-샤이에 환자에서 평가한다. 대상체는 말초 정맥 내로의 벡터의 단회 주입을 받는데, 이는 전임상 데이터를 기반으로 하여 정상 대상체에서 수득되는 것과 가까운 수준으로 상기 효소를 안정하게 생성하여야 한다. 상기 실험은 상이한 용량의 벡터, 예를 들어 3 x 10^{11} GC/kg; 1 x 10^{12} GC/kg; 3 x 10^{12} GC/kg을 포함할 수 있으며, 용량 범위를 첨가한다. 효능의 가장 비침습적인 평가는 상기 질환에서 상승하고 ERT 후에 부분적으로 바로잡아지는 소변중 GAG의 수준이다. 트랜스진의 접목(engraftment) 및 그의 발현 수준은 혈청중 IDUA의 측정에 의해 결정된다. 소변중 GAG를 유전자 요법 전 및 유전자 요법 후에 또한 측정한다.

[0095] (서열목록 자유텍스트)

[0096] 식별 기호 <223> 하의 자유텍스트를 포함하는 서열에 대한 하기 정보가 제공된다.

서열 번호 (자유텍스트를 포함함)	<223> 하의 자유텍스트
서열 번호 3	<220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> enhancer <222> (221)..(320) <223> Alpha mic/bik <220> <221> enhancer <222> (327)..(426) <223> Alpha mic/bik <220> <221> promoter <222> (442)..(901) <223> TBG promoter <220> <221> TATA_signal <222> (885)..(888) <220> <221> Intron <222> (1027)..(1159) <223> intron 1 <220> <221> CDS <222> (1251)..(3212) <223> human alpha-L-IDUE <220> <221> polyA_signal <222> (3261)..(3387) <220> <221> repeat_region <222> (3476)..(3605) <223> 3' ITR (located on complement) <220> <221> rep_origin

[0097]

서열 번호 (자유텍스트를 포함함)	<223> 하의 자유텍스트
	<222> (3782)..(4220) <223> f1\ori (located on complement) <220> <221> rep_origin <222> (4249)..(4891) <223> pUC\origin of replication\ <220> <221> misc_feature <222> (5566)..(6381) <223> kanamycin resistance located on complementary strand

[0098]

[0099] "Z6622PCT_ST25.txt"로 라벨링된 서열 목록은 전자 형태로 본 출원과 함께 출원되어 있으며; 이 서열 목록은 본원에 참고로 포함된다. 2013년 3월 15일자로 출원된 우선권 주장 출원 미국 특허 출원 제61/788,724호를 비롯하여 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참고로 포함되는 것으로 지시되는 것처럼 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 전술한 발명은 예시로서 그리고 이해의 명확함을 위한 예로서 약간 상세하게 기술되었지만, 본 발명의 교시를 고려하면 첨부된 청구범위의 사상 또는 범주로부터 벗어나지 않고서도 특정한 변화 및 변경이 본 발명에 대하여 이루어질 수 있음이 당업자에게 쉽게 자명해질 것이다.

도면

도면1a

pENN.AAV.TBG.PI. 6863 bp DNA **원형**

특징	위치/정성자(qualifier)
misc_structure	complement(5566..6381) /vntifkey="88" /label=Kan-r
rep_origin	4249..4891 /vntifkey="33" /label=pUC\origin\of\replication
promoter	442..901 /vntifkey="29" /label=TBG
TATA_signal	885..888 /vntifkey="41" /label=TATA
enhancer	221..320 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
enhancer	327..426 /vntifkey="9" /label=Alpha\mic/bik
intron	1027..1159 /vntifkey="15" /label=Intron_1 /note="chimeric intron"
polyA_signal	3261..3387 /vntifkey="25" /label=Rabbit\globin\poly\A
repeat_region	1..130 /vntifkey="34" /label=5'\ITR
repeat_region	complement(3476..3605) /vntifkey="34" /label=3'\ITR
rep_origin	complement(3782..4220) /vntifkey="33" /label=f1\ori
CDS	1251..3212 /vntifkey="4" /label=Human\alpha-L-IDUA

도면1b

염기 카운트(count) 1584 a 1971 c 1702 g 1606 t

기원

```
   1 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt
  61 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact
 121 aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg
 181 atcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca
 241 gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggttaataat
 301 ctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaag
 361 tggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaa
 421 cattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg acatcatttc ctctgcgaat
 481 gcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaa
 541 ctttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagtgag aacttttcc
 601 tgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc
 661 agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaag
 721 ggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcatttttg ctttgttcct
 781 cttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggtt
 841 aatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaaga
 901 tgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat tgctaacgca
 961 gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc gtgaggcact
1021 gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg
1081 tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccac
1141 tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagt
1201 acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atgcggcccc
1261 tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc cctcctgtgg
1321 cccctgccga agcccctcac ctggtgcatg tggatgccgc cagagccctg tggcctctgc
1381 ggagattctg gcggagcacc ggcttttgcc ccccactgcc tcacagccag gccgaccagt
1441 acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg ccccacagag
1501 gcatcaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaactggt gacaacccgg ggctccaccg
1561 gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg ctgagagaga
1621 accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc accgacttcg
1681 aggacaagca gcaagtcttt gagtggaagg acctggtgtc cagcctggcc agacggtaca
1741 tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaactt cgagacatgg aacgagcccg
1801 accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac tactacgacg
1861 cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actgggcgga cccggcgata
1921 gcttccacac ccccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac tgccacgacg
1981 gcaccaattt cttcaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc ctgcaccgga
2041 agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc cagcagatcc
2101 ggcagctgtt ccccaagttc gccgacaccc ccatctacaa cgacgaggcc gacccctgg
2161 tgggatggtc actgcctcag ccttggagag ccgacgtgac ctacgccgct atggtggtga
2221 aagtgatcgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc ttcccttacg
2281 ccctgctgag caacgacaac gccttcctga gctaccaccc ccacccctc gcccagagaa
2341 ccctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagaccccc ccacgtgcag ctgctgagaa
2401 agcccgtgct gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag ctgtgggccg
2461 aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggcgtg ctggcctccg
2521 cccacagacc tcagggaccc gccgatgctt ggcgggctgc cgtgctgatc tacgccagcg
2581 acgataccag agcccacccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg agaggcgtgc
2641 caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg tgcagccccg
2701 acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgccgagcag ttccggcgga
2761 tgagagccgc tgaggatcct gtggctgctg cccctagacc tctgcctgct ggcggcagac
```

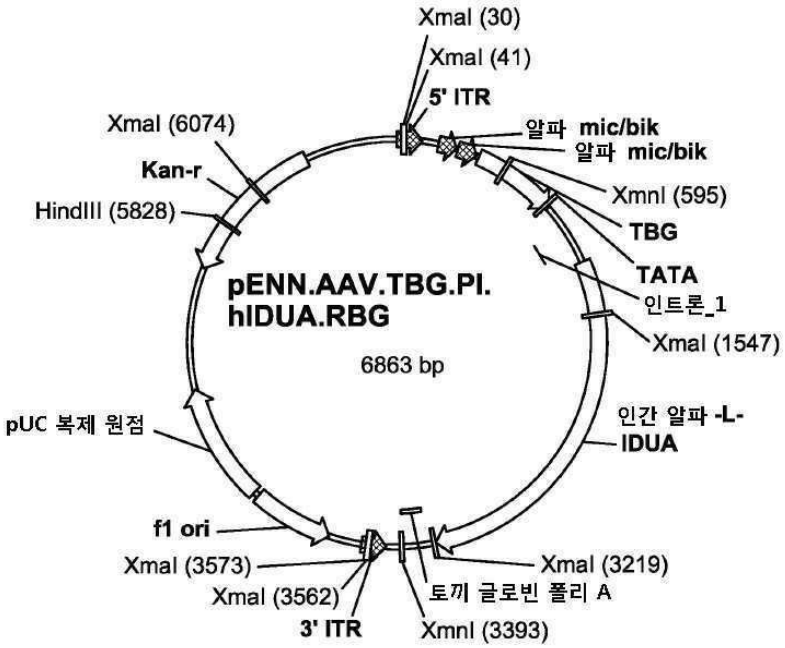
도면1c

```
2821 tgaccctgag gcccgctctg agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtg tgcgccaggc
2881 ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gcccctgacc cagggccagc
2941 tggtgctggt gtggtccgat gagcacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc tacgagatcc
3001 agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagcccagc accttcaacc
3061 tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtccggctc ttatagagtg cgggccctgg
3121 actactgggc cagacccggc cctttcagcg accccgtgcc ctacctggaa gtgcccgtgc
3181 ctagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gagtcgaccc gggcggcctc gaggacgggg
3241 tgaactacgc ctgaggatcc gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga
3301 agccccttga gcatctgact tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt
3361 gttggaattt tttgtgtctc tcactcggaa gcaattcgtt gatctgaatt tcgaccaccc
3421 ataataccca ttaccctggt agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa
3481 cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg
3541 cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg
3601 cgcagcctta attaacctaa ttcactggcc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac
3661 cctggcgtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat
3721 agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg
3781 gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc
3841 gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cctttcgctt tcttcccttc ctttctcgcc
3901 acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttttagg gttccgattt
3961 agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg
4021 ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt
4081 ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggtctattc ttttgattta
4141 taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt
4201 aacgcgaatt ttaacaaaat catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa
4261 aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca tcacaaaaat
4321 cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc
4381 cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc
4441 gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt
4501 tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aaccccccgt tcagcccgac
4561 cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg
4621 ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca
4681 gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc
4741 gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa
4801 accaccgctg gtagcggtgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa
4861 ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac
4921 tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatccttttg
4981 atcctccggc gttcagcctg tgccacagcc gacaggatgg tgaccaccat ttgccccata
5041 tcaccgtcgg tactgatccc gtcgtcaata aaccgaaccg ctacaccctg agcatcaaac
5101 tcttttatca gttggatcat gtcggcggtg tcgcggccaa gacggtcgag cttcttcacc
5161 agaatgacat caccttcctc caccttcatc ctcagcaaat ccagcccttc ccgatctgtt
5221 gaactgccgg atgccttgtc ggtaaagatg cggttagctt ttacccctgc atctttgagc
5281 gctgaggtct gcctcgtgaa gaaggtgttg ctgactcata ccaggcctga atcgccccat
5341 catccagcca gaaagtgagg gagccacggt tgatgagagc tttgttgtag gtggaccagt
5401 tggtgatttt gaacttttgc tttgccacgg aacggtctgc gttgtcggga agatgcgtga
5461 tctgatcctt caactcagca aaagttcgat ttattcaaca aagccgccgt cccgtcaagt
5521 cagcgtaatg ctctgccagt gttacaacca attaaccaat tctgattaga aaaactcatc
5581 gagcatcaaa tgaaactgca atttattcat atcaggatta tcaataccat atttttgaaa
5641 aagccgtttc tgtaatgaag gagaaaactc accgaggcag ttccatagga tggcaagatc
```

도면1d

```
5701 ctggtatcgg tctgcgattc cgactcgtcc aacatcaata caacctatta atttcccctc
5761 gtcaaaaata aggttatcaa gtgagaaatc accatgagtg acgactgaat ccggtgagaa
5821 tggcaaaaagc ttatgcattt ctttccagac ttgttcaaca ggccagccat tacgctcgtc
5881 atcaaaatca ctcgcatcaa ccaaaccgtt attcattcgt gattgcgcct gagcgagacg
5941 aaatacgcga tcgctgttaa aaggacaatt acaaacagga atcgaatgca accggcgcag
6001 gaacactgcc agcgcatcaa caatatttcc acctgaatca ggatattctt ctaatacctg
6061 gaatgctgtt ttcccgggga tcgcagtggt gagtaaccat gcatcatcag gagtacggat
6121 aaaatgcttg atggtcggaa gaggcataaa ttccgtcagc cagtttagtc tgaccatctc
6181 atctgtaaca tcattggcaa cgctaccttt gccatgtttc agaaacaact ctggcgcatc
6241 gggcttccca tacaatcgat agattgtcgc acctgattgc ccgacattat cgcgagccca
6301 tttataccca tataaatcag catccatgtt ggaatttaat cgcggcctcg agcaagacgt
6361 ttcccgttga atatggctca taacacccct tgtattactg tttatgtaag cagacagttt
6421 tattgttcat gatgatatat ttttatcttg tgcaatgtaa catcagagat tttgagacac
6481 catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg
6541 agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc
6601 ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag
6661 ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag
6721 ttagctcact cattaggcac cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg
6781 tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccag
6841 atttaattaa ggccttaatt agg
```

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Compositions and Methods for Treating MPS1

<130> UPN-Z6622PCT

<140> PCT/US2014/025509

<141> 2014-03-13

<150> 61/788724

<151> 2013-03-15

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1971

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcggcccc tgaggcctag agctgctctg ctggcactgc tggccagtct gctggctgcc 60

cctcctgtgg cccctgccga agcccctcac ctggtgcatg tggatgccgc cagagccctg 120

tggcctctgc ggagattctg gcggagcacc ggcttttgcc ccccactgcc tcacagccag 180

gccgaccagt acgtgctgag ctgggaccag cagctgaacc tggcctacgt gggcgccgtg 240

ccccacagag gcatcaaaca ggtgagaacc cactggctgc tggaactggt gacaacccgg 300

ggctccaccg gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg 360

ctgagagaga accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gcagcgccag cggccacttc 420

accgacttcg aggacaagca gcaagtcttt gagtggaagg acctggtgtc cagcctggcc 480

agacggtaca tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaactt cgagacatgg 540

aacgagcccg accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac 600

tactacgacg cctgctccga gggcctgaga gccgccagtc ctgccctgag actgggcgga 660

cccggcgata gcttccacac ccccccccaga agccccctga gctggggcct gctgagacac 720

tgccacgacg gcaccaattt cttcaccggc gaggccggcg tgcggctgga ctacatcagc 780

ctgcaccgga agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaggaaaa ggtcgtcgcc 840

cagcagatcc ggcagctgtt ccccaagttc gccgacaccc ccatctacaa cgacgaggcc 900

gacccccctgg tgggatggtc actgcctcag ccttggagag ccgacgtgac ctacgccgct 960

atggtggtga aagtgatcgc ccagcatcag aacctgctgc tggccaacac caccagcgcc 1020

ttcccttacg ccctgctgag caacgacaac gccttcctga gctaccaccc ccacccccttc 1080

gcccagagaa ccctgaccgc ccggttccag gtgaacaaca ccagaccccc ccacgtgcag 1140

ctgctgagaa agcccgtgct gaccgctatg ggactgctgg ctctgctgga cgaggaacag 1200

ctgtgggccg aagtgtccca ggccggcacc gtgctggaca gcaatcatac agtgggcgtg 1260

ctggcctccg cccacagacc tcagggaccc gccgatgctt ggcgggctgc cgtgctgatc 1320

tacgccagcg acgataccag agcccacccc aacagatccg tggccgtgac cctgcggctg 1380

agaggcgtgc caccaggccc tggactggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg 1440

tgcagccccg acggcgaatg gcgcagactg ggcagacctg tgttccccac cgccgagcag 1500

ttccggcgga tgagagccgc tgaggatcct gtggctgctg cccctagacc tctgcctgct 1560

ggcggcagac tgaccctgag gcccgctctg agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtg 1620

tgcgccaggc ccgagaagcc tcccggccag gtgacaagac tgagagccct gcccctgacc 1680

cagggccagc tggtgctggt gtggtccgat gagcacgtgg gcagcaagtg cctgtggacc 1740

tacgagatcc agttcagcca ggacggcaag gcctacaccc ccgtgtcccg gaagcccagc 1800

accttcaacc tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtccggctc ttatagagtg 1860

cgggccctgg actactgggc cagacccggc cctttcagcg accccgtgcc ctacctggaa 1920

gtgcccgtgc ctagaggccc ccctagcccc ggcaaccctt gagtcgaccc g 1971

<210> 2

<211> 653

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

```
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
    210                 215                 220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

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

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

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

            420                 425                 430
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
        435                 440                 445
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
```

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 3

<211> 6863

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (plasmid carrying hIDUA)

<220><221> repeat_region

<222> (1)..(130)

<223> 5' ITR

<220><221> enhancer

<222

> (221)..(320)

<223> Alpha mic/bik

<220><221> enhancer

<222> (327)..(426)

<223> Alpha mic/bik

<220><221> promoter

<222> (442)..(901)

<223> TBG promoter

<220><221> TATA_signal

<222> (885)..(888)

<220><221> Intron

<222> (1027)..(1159)

<223> intron 1

<220><221> CDS

<222> (1251)..(3212)

<223> human alpha-L-IDUE

<220><221> polyA_signal

<222> (3261)..(3387)

<220><221> repeat_region

<222> (3476)..(3605)

<223> 3' ITR (located on complement)

<220><221> rep_origin

<222> (3782)..(4220)

<223> f1₩ori (located on complement)

<220><221> rep_origin

<222> (4249)..(4891)

<223> pUC₩origin of replication₩

<220><221> misc_feature

<222> (5566)..(6381)

<223> kanamycin resistance located on complementary strand

<400> 3

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcactaggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatggggatcctctaga actatagcta gaattcgccc ttaagctagc aggttaattt ttaaaaagca

gtcaaaagtc caagtggccc ttggcagcat ttactctctc tgtttgctct ggttaataatctcaggagca caaacattcc agatccaggt taatttttaa aaagcagtca aaagtccaagtggcccttgg cagcatttac tctctctgtt tgctctggtt aataatctca ggagcacaaacattccagat ccggcgcgcc agggctggaa gctacctttg acatcatttc ctctgcgaatgcatgtataa tttctacaga acctattaga aaggatcacc cagcctctgc ttttgtacaactttccctta aaaaactgcc aattccactg ctgtttggcc caatagtgag aacttttccctgctgcctct tggtgctttt gcctatggcc cctattctgc ctgctgaaga cactcttgcc

agcatggact taaacccctc cagctctgac aatcctcttt ctcttttgtt ttacatgaaggggtctggcag ccaaagcaat cactcaaagt tcaaacctta tcatttttg ctttgttcctcttggccttg gttttgtaca tcagctttga aaataccatc ccagggttaa tgctggggttaatttataac taagagtgct ctagttttgc aatacaggac atgctataaa aatggaaagatgttgctttc tgagagacag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat tgctaacgcagtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc gtgaggcactgggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag accaatagaa actgggcttg

tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac tgacatccactttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta aggctagagtacttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac gcgtgccacc atg cgg
Met Arg
1

ccc ctg agg cct aga gct gct ctg ctg gca ctg ctg gcc agt ctg ctg
Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu

5 10 15

gct gcc cct cct gtg gcc cct gcc gaa gcc cct cac ctg gtg cat gtg
Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val His Val

20 25 30

gat gcc gcc aga gcc ctg tgg cct ctg cgg aga ttc tgg cgg agc acc
Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr

35 40 45 50

ggc ttt tgc ccc cca ctg cct cac agc cag gcc gac cag tac gtg ctg 1448
Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu
55 60 65

agc tgg gac cag cag ctg aac ctg gcc tac gtg ggc gcc gtg ccc cac 1496
Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His
70 75 80

aga ggc atc aaa cag gtg aga acc cac tgg ctg ctg gaa ctg gtg aca 1544

Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr
85 90 95

acc cgg ggc tcc acc ggc aga ggc ctg agc tac aac ttc acc cac ctg 1592
Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu
100 105 110

gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga gag aac cag ctg ctg ccc ggc ttc 1640
Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe

115 120 125 130

gag ctg atg ggc agc gcc agc ggc cac ttc acc gac ttc gag gac aag 1688
Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys
135 140 145

cag caa gtc ttt gag tgg aag gac ctg gtg tcc agc ctg gcc aga cgg 1736
Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg
150 155 160

tac atc ggc aga tac gga ctg gcc cac gtg tcc aag tgg aac ttc gag 1784
Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu
165 170 175

aca tgg aac gag ccc gac cac cac gac ttc gac aac gtg tca atg acc 1832
Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr
180 185 190

atg cag ggc ttt ctg aac tac tac gac gcc tgc tcc gag ggc ctg aga 1880

```
Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg
195                 200                 205                 210
gcc gcc agt cct gcc ctg aga ctg ggc gga ccc ggc gat agc ttc cac       1928
Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His
                215                 220                 225
acc ccc ccc aga agc ccc ctg agc tgg ggc ctg ctg aga cac tgc cac       1976
Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His


            230                 235                 240
gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc gag gcc ggc gtg cgg ctg gac tac       2024
Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr
        245                 250                 255
atc agc ctg cac cgg aag ggc gcc aga agc agc atc agc atc ctg gaa       2072
Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu
    260                 265                 270


cag gaa aag gtc gtc gcc cag cag atc cgg cag ctg ttc ccc aag ttc       2120
Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe
275                 280                 285                 290
gcc gac acc ccc atc tac aac gac gag gcc gac ccc ctg gtg gga tgg       2168
Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp
                295                 300                 305
tca ctg cct cag cct tgg aga gcc gac gtg acc tac gcc gct atg gtg       2216


Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val
            310                 315                 320
gtg aaa gtg atc gcc cag cat cag aac ctg ctg ctg gcc aac acc acc       2264
Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr
        325                 330                 335
agc gcc ttc cct tac gcc ctg ctg agc aac gac aac gcc ttc ctg agc       2312
Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser


    340                 345                 350
tac cac ccc cac ccc ttc gcc cag aga acc ctg acc gcc cgg ttc cag       2360
Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln
```

```
355                 360                 365                 370
gtg aac aac acc aga ccc ccc cac gtg cag ctg ctg aga aag ccc gtg       2408
Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val
                375                 380                 385

ctg acc gct atg gga ctg ctg gct ctg ctg gac gag gaa cag ctg tgg       2456
Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp
            390                 395                 400
gcc gaa gtg tcc cag gcc ggc acc gtg ctg gac agc aat cat aca gtg       2504
Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val
        405                 410                 415
ggc gtg ctg gcc tcc gcc cac aga cct cag gga ccc gcc gat gct tgg       2552

Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp
    420                 425                 430
cgg gct gcc gtg ctg atc tac gcc agc gac gat acc aga gcc cac ccc       2600
Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro
435                 440                 445                 450
aac aga tcc gtg gcc gtg acc ctg cgg ctg aga ggc gtg cca cca ggc       2648
Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly

                455                 460                 465
cct gga ctg gtg tac gtg acc aga tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc       2696
Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser
            470                 475                 480
ccc gac ggc gaa tgg cgc aga ctg ggc aga cct gtg ttc ccc acc gcc       2744
Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala
        485                 490                 495

gag cag ttc cgg cgg atg aga gcc gct gag gat cct gtg gct gct gcc       2792
Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala
    500                 505                 510
cct aga cct ctg cct gct ggc ggc aga ctg acc ctg agg ccc gct ctg       2840
Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu
515                 520                 525                 530
```

```
aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg cac gtg tgc gcc agg ccc gag aag       2888

Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys
                535                 540                 545
cct ccc ggc cag gtg aca aga ctg aga gcc ctg ccc ctg acc cag ggc       2936
Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly
            550                 555                 560
cag ctg gtg ctg gtg tgg tcc gat gag cac gtg ggc agc aag tgc ctg       2984
Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu

        565                 570                 575
tgg acc tac gag atc cag ttc agc cag gac ggc aag gcc tac acc ccc       3032
Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro
    580                 585                 590
gtg tcc cgg aag ccc agc acc ttc aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat       3080
Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp
595                 600                 605                 610

aca ggc gcc gtg tcc ggc tct tat aga gtg cgg gcc ctg gac tac tgg       3128
Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp
                615                 620                 625
gcc aga ccc ggc cct ttc agc gac ccc gtg ccc tac ctg gaa gtg ccc       3176
Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro
            630                 635                 640
gtg cct aga ggc ccc cct agc ccc ggc aac cct tga gtcgacccgg            3222

Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
        645                 650
gcggcctcga ggacggggtg aactacgcct gaggatccga tctttttccc tctgccaaaa     3282
attatgggga catcatgaag ccccttgagc atctgacttc tggctaataa aggaaattta     3342
ttttcattgc aatagtgtgt tggaattttt tgtgtctctc actcggaagc aattcgttga     3402
tctgaatttc gaccacccat aatacccatt accctggtag ataagtagca tggcgggtta     3462
atcattaact acaaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc     3522
```

tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc 3582

tcagtgagcg agcgagcgcg cagccttaat taacctaatt cactggccgt cgttttacaa 3642

cgtcgtgact gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc 3702

ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc 3762

agcctgaatg gcgaatggga cgcgccctgt agcggcgcat taagcgcggc gggtgtggtg 3822

gttacgcgca gcgtgaccgc tacacttgcc agcgccctag cgcccgctcc tttcgctttc 3882

ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc 3942

cctttagggt tccgatttag tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt 4002

gatggttcac gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag 4062

tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa ccctatctcg 4122

gtctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattggtt aaaaaatgag 4182

ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatca tgtgagcaaa aggccagcaa 4242

aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccccc 4302

gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa 4362

agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg 4422

cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca 4482

cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa 4542

ccccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaacccg 4602

gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg 4662

tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtggccta actacggcta cactagaaga 4722

acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc 4782

tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggt agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag 4842

attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac 4902

gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc 4962

ttcacctaga tccttttgat cctccggcgt tcagcctgtg ccacagccga caggatggtg 5022

accaccattt gccccatatc accgtcggta ctgatcccgt cgtcaataaa ccgaaccgct 5082

acaccctgag catcaaactc ttttatcagt tggatcatgt cggcggtgtc gcggccaaga 5142

cggtcgagct tcttcaccag aatgacatca ccttcctcca ccttcatcct cagcaaatcc 5202

agcccttccc gatctgttga actgccggat gccttgtcgg taaagatgcg gttagctttt 5262

acccctgcat ctttgagcgc tgaggtctgc ctcgtgaaga aggtgttgct gactcatacc 5322

aggcctgaat cgccccatca tccagccaga aagtgaggga gccacggttg atgagagctt 5382

tgttgtaggt ggaccagttg gtgattttga acttttgctt tgccacggaa cggtctgcgt 5442

tgtcgggaag atgcgtgatc tgatccttca actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa 5502

gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc 5562

tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg aaactgcaat ttattcatat caggattatc 5622

aataccatat ttttgaaaaa gccgtttctg taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt 5682

ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc tgcgattccg actcgtccaa catcaataca 5742

acctattaat ttcccctcgt caaaaataag gttatcaagt gagaaatcac catgagtgac 5802

gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt atgcatttct ttccagactt gttcaacagg 5862

ccagccatta cgctcgtcat caaaatcact cgcatcaacc aaaccgttat tcattcgtga 5922

ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgatc gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat 5982

cgaatgcaac cggcgcagga acactgccag cgcatcaaca atattttcac ctgaatcagg 6042

atattcttct aatacctgga atgctgtttt cccggggatc gcagtggtga gtaaccatgc 6102

atcatcagga gtacggataa aatgcttgat ggtcggaaga ggcataaatt ccgtcagcca 6162

gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc attggcaacg ctacctttgc catgtttcag 6222

aaacaactct ggcgcatcgg gcttcccata caatcgatag attgtcgcac ctgattgccc 6282

gacattatcg cgagcccatt tatacccata taaatcagca tccatgttgg aatttaatcg 6342

cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat atggctcata acacccctg tattactgtt 6402

tatgtaagca gacagtttta ttgttcatga tgatatattt ttatcttgtg caatgtaaca 6462

tcagagattt tgagacacca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg 6522

tattaccgcc tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga 6582

gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg 6642

gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg 6702

caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct 6762

tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta 6822

tgaccatgat tacgccagat ttaattaagg ccttaattag g 6863

<210> 4

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

```
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1               5                  10                  15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
            20                  25                  30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
        35                  40                  45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

    50                  55                  60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65                  70                  75                  80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
                85                  90                  95
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
            100                 105                 110
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

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

            180                 185                 190
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
        195                 200                 205
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
    210                 215                 220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225                 230                 235                 240
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
```

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (forward primer)

<400> 5

gccaaaaatt atggggacat 20

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic (probe)

<400> 6

atgaagcccc ttgagcatct gacttct 27

<210> 7

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic hIDUA variant

<400> 7

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

Gln Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

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

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

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

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

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

<210> 8

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic hIDUA variant 020976

<400> 8

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

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

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

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

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

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

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

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

595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 9

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><

223> Synthetic (hIDUA variant 003356)

<400> 9

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Gln Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

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

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

245 250 255
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 10
<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic (hIDUA variant 003367)
<400> 10
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 11
<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic (hIDUA variant 003359)
<400> 11
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

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

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

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195 200 205

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

260 265 270

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

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
355 360 365
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 12
<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic sequence (hIDAU variant 017436)
<400> 12
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
115 120 125
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Arg Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 13

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence (hIDUA variant 003364)

<400> 13

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
210 215 220
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225 230 235 240
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
245 250 255
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
275 280 285
Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
290 295 300
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305 310 315 320
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
340 345 350
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Thr Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
355 360 365
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
385 390 395 400

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

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465 470 475 480
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
485 490 495
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510
Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

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

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

<210> 14

<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic (hIDUA variant 066228)
<400> 14

```
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1               5                  10                  15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
            20                  25                  30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
        35                  40                  45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
    50                  55                  60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65                  70                  75                  80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
                85                  90                  95
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
            100                 105                 110

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

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

Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
```

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

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

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540

Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

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

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

<210> 15

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence (hIDUA 003372)

<400> 15

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro

275 280 285

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

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

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

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620
Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu
625 630 635 640
Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro
645 650

<210> 16
<211> 653
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Synthetic sequence (hIDUA variant 0066231)
<400> 16
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60
Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

```
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
            100                 105                 110
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

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

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

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

305                 310                 315                 320
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn
                325                 330                 335
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
```

340 345 350

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

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys

370 375 380

Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Thr Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp
610 615 620

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

625 630 635 640

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

<210> 17

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic (hIDUA variant A622T)

<400> 17

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

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

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

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

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
                165                 170                 175
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
            180                 185                 190
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
        195                 200                 205
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser
    210                 215                 220

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

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

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

385 390 395 400

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His

405 410 415

Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp

420 425 430

Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

435 440 445

His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro

450 455 460

Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu

465 470 475 480

Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro

485 490 495

Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala

500 505 510

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro

515 520 525

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro

530 535 540

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

545 550 555 560

Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys

565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Thr Leu Asp

610 615 620

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

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650