



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월12일

(11) 등록번호 10-2819396

(24) 등록일자 2025년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/51 (2006.01) A61K 31/205 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01) A61P 17/14 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/51 (2013.01)

A61K 31/205 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7013230

(22) 출원일자(국제) 2016년11월09일

심사청구일자 2021년11월08일

(85) 번역문제출일자 2018년05월09일

(65) 공개번호 10-2018-0074703

(43) 공개일자 2018년07월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/061050

(87) 국제공개번호 WO 2017/083327

국제공개일자 2017년05월18일

(30) 우선권주장

14/935,690 2015년11월09일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014120770 A1\*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 17 항

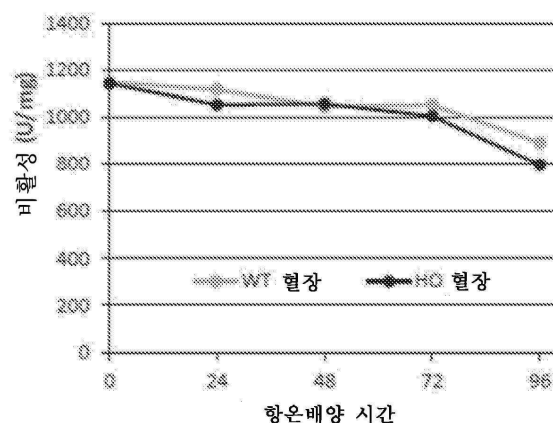
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 호모시스틴뇨증의 치료를 위한 조성물 및 방법

## (57) 요약

호모시스틴뇨증 및 관련 질환 및 장애의 치료에서 변형된 인간 시스타티오닌 베타 신타제(CBS)를 이용한 효소 대체 요법을 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**A61K 47/60** (2017.08)

**A61P 17/14** (2018.01)

**A61P 19/10** (2018.01)

**A61P 27/02** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2023.05)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180074703 A\*

JP1980005429 A\*

JP2022002966 A\*

JP2008222966 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 대상체에서 호모시스틴뇨증을 치료하기 위한 단리된 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물로서,

(a) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 서열번호 13의 아미노산 서열의 아미노산 2-413을 포함하고 적어도 하나 또는 다수의 PEG 분자에 공유적으로 연결되며,

(b) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 0.33 mg/kg 내지 10 mg/kg의 투여량으로 적어도 6주 동안 적어도 주 1회 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PEG가 저분자량 선형 PEG인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PEG가 고분자량 4개 암(arm) 분지형 PEG인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 베타인과 함께 공동-투여되거나 베타인이 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드의 투여 전에 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 상기 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 적어도 주 2회 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

#### 청구항 12

삭제

#### 청구항 13

삭제

#### 청구항 14

삭제

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

제1항 내지 제3항, 제8항 및 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 20 kDa 이상의 분자량을 갖는 적어도 하나 또는 다수의 NHS 에스테르-활성화된 PEG 분자에 공유적으로 연결된, 약제학적 조성물.

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

인간 대상체에서 시스타티오닌 및/또는 시스테인을 증가시키는 방법에 사용하기 위한 단리된 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물로서,

(a) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 서열번호 13의 아미노산 서열의 아미노산 2-413을 포함하고 적어도 하나 또는 다수의 PEG 분자에 공유적으로 연결되며,

(b) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 0.33 mg/kg 내지 10 mg/kg의 투여량으로 적어도 6주 동안 적어도 주 1회 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 시스타티오닌의 양이 0.008  $\mu$ M 초과로 또는 0.005 내지 0.35  $\mu$ M로 증가되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 시스테인의 양이 140  $\mu$ M 초과로 또는 200  $\mu$ M 내지 400  $\mu$ M로 증가되는, 약제학적



조성물.

#### 청구항 27

인간 대상체에서 호모시스테인, 메티오닌 및/또는 S-아데노실 호모시스테인을 감소시키는 방법에 사용하기 위한 단리된 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 약제학적 조성물로서,

(a) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 서열번호 13의 아미노산 서열의 아미노산 2-413을 포함하고 적어도 하나 또는 다수의 PEG 분자에 공유적으로 연결되며,

(b) 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 0.33 mg/kg 내지 10 mg/kg의 투여량으로 적어도 6주 동안 적어도 주 1회 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 상기 호모시스테인의 양이 100  $\mu$ M 미만인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 상기 메티오닌의 양이 50  $\mu$ M 미만인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 30

제28항에 있어서, 상기 S-아데노실 호모시스테인의 양이 0.14  $\mu$ M 미만으로 감소되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 31

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 적어도 주 2회 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG가 저분자량 선형 PEG 또는 고분자량 4개 암(arm) 분지형 PEG인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 35

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 20 kDa 이상의 분자량을 갖는 적어도 하나 또는 다수의 NHS 에스테르-활성화된 PEG 분자에 공유적으로 연결된, 약제학적 조성물.

#### 청구항 36

삭제

#### 청구항 37

삭제

#### 청구항 38

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드가 베타인과 함께 공동-투여되거나 베타인이 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드 전에 투여되는, 약제학적 조성물.

#### 청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 관련 출원에 관한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 11월 9일자로 출원된 미국 출원 제14/935,690호를 우선권으로 주장하며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열목록과 함께 출원된다. 2016-11-08\_Sequence Listing\_2089.1003PCT2.txt란 표제의 서열목록 파일은 2016년 11월 8일자로 작성되었으며 크기가 26.2 킬로바이트이다. 서열목록의 전자 포맷의 정보는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 혈청 호모시스테인(Hcy) 농도를 현저하게 감소시키고 시스타티오닌 및 시스테인과 같은 이의 하류 대사산물의 수준을 복구시키기 위한 인간 시스타티오닌 베타-신타제(CBS) 또는 이의 변형된 버전(예를 들면, 인간 절두형(truncated) CBS(htCBS) 또는 이의 변이체)을 이용한 효소 대체 요법(enzyme replacement therapy; ERT)에 관한 것이다. 게다가, CBS, htCBS, 또는 htCBS 돌연변이 C15S와 같은 이의 변형된 버전을 이용한 ERT는 호모시스틴뇨증 및 호모시스테인 재메틸화 장애와 같은 질환들의 치료를 위해 사용될 수 있다.

**배경 기술**

[0007] 시스타티오닌 베타-신타제(CBS)는 세린과 호모시스테인(Hcy)의 시스타티오닌으로의 축합을 촉매하는 황전이(transsulfuration) 경로의 첫번째 효소이며, 이때 시스타티오닌은 시스타티오닌 감마-리아제(CGL)에 의해 시스테인으로 가수분해된다. 시스템 생물학에서, 생물학적 시스템의 강건성은 동요에 직면했을 때 적절하게 기능하는 이의 능력으로서 정의되며, 시스템 내의 요소들의 중복성은 이러한 강건성이 달성되도록 하는 기전들 중 하나이다(참조: Kitano, H. 2004, Nature Reviews Genetics, 5:826-837). 그러나, 생물학적 황전이 시스템은 성분들의 중복성이 상당히 부족한 것으로 보이며 이로 인해 상기 시스템은 돌연변이적 동요가 발생하기가 쉽다. 예를 들면, CBS 효소는 호모시스테인을 시스타티오닌으로 프로세싱할 수 있는 유일한 성분이다. 제한된 시스템 중복성은 상기 경로로 들어가는 첫번째 대사산물인 호모시스테인으로서 부분적으로 존재하고, 호모시스테인은 대안으로 재메틸화 경로를 통해서 메티오닌으로 전환될 수 있고 이로써 호모시스테인 로드가 완화된다. 또한, 하류 생성물인 시스테인은 식이로부터 직접 획득될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 경로들은 정상적인 대사산물 수준을 유지하는 능력이 한정되어 있고, CBS 기능의 부족은 치료되지 않은 채 방치된다면 인간 환자에게 해로운 결과를 가져온다. CBS의 불활성화는 보다 흔히 전형적인 호모시스틴뇨증으로서 지칭되는 시스타티오닌 베타-신타제-결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)을 초래한다.

[0008] CBSDH를 치료하기 위한 한정된 치료 옵션이 존재하고, 현재의 치료 옵션은 호모시스테인을 감소시키지만 시스타티오닌(Cth) 또는 시스테인(Cys)을 정상화시키려 하지 않으며, 따라서 이러한 치료 옵션들은 강건하고 효과적인 치료 옵션을 제공하기에 불충분할 수 있다. 따라서, 당업계에는 호모시스틴뇨증을 앓는 개체들을 위한 보다 효과적인 치료 전략의 필요성이 여전히 남아있다.

[0009] 본 발명은 CBSDH의 치료를 위한 조성물 및 이러한 조성물의 사용 방법을 제공함으로써 이러한 필요성을 해결한다.

**발명의 내용**

[0010] **발명의 요약**

[0011] 본 발명은 폐길화(PEGylation)될 수도 있는 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 및 이의 변이체를 포함하는 효소 대체 요법에 적합한 조성물을 제공한다. htCBS 조성물은 호모시스테인 수준을 감소시키고 하류 대사산물 시스타티오닌 및 시스테인의 수준을 상승시키는데 사용될 수 있고 호모시스틴뇨증(예를 들면, CBSDH) 및 호모시스테인 재메틸화 장애와 같은 병태 및 질환을 치료하는데 사용될 수 있으며 또한 간 병리상태를 개선시키는데 사용될 수 있다.

[0012] 본원에는 단리된 htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체의 호모시스틴뇨증을 치료하는 방법이 제공된다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 저분자량 또는 고분자량 PEG으로 폐길화될 수 있다. 특정 실시형태에서, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 접합을 위해 다양한 기하학 및 상이한 화학을 갖는 PEG 분자로 폐길화될 수 있다. 일부 실시형태에서, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 0.01 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고 적어도 주 1회 투여될 수 있다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 5 내지 7.5 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고 적어도 주 2회 투여될 수 있다. 게다가, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 베타인 또는 기타 공지된 CBSDH 요법들과 함께 공동투여될 수 있다.

[0013] 본원에서는 htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 시스타티오닌 및 시스테인과 같으나 이에 한정되지 않는 대사산물의 양을 증가시키는 방법이 제공된다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 저분자량 또는 고분자량 PEG로 폐길화될 수 있다. 일부 실시형태에서, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 0.01 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고 적어도 주 1회 투여될 수 있다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 5 내지 7.5 mg/kg의 투여량에서 투여될 수 있고 적어

도 주 2회 투여될 수 있다. 게다가, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 베타인과 함께 공동투여될 수 있다. 시스타티오닌의 양은 0.005 내지 0.35  $\mu\text{M}$ 으로 증가될 수 있다. 시스테인의 양은 약 140  $\mu\text{M}$ 을 상회하여 (예를 들면, 200  $\mu\text{M}$  내지 400  $\mu\text{M}$ ) 증가될 수 있다.

[0014] 본원에서는 htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 호모시스테인, 메티오닌 S-아데노실 호모시스테인 및 S-아데노실 메티오닌과 같으나 이에 한정되지 않는 대사산물의 양을 감소시키는 방법이 제공된다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 저분자량 또는 고분자량 PEG로 폐길화될 수 있다. 일부 실시형태에서, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 0.01 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들면, 투여량은 약 0.4 mg/kg이다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 5 내지 7.5 mg/kg의 투여량에서 투여될 수 있고 적어도 주 2회 투여될 수 있다. 게다가, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 베타인과 함께 공동투여될 수 있다. 호모시스테인의 양은 100  $\mu\text{M}$  미만(예를 들면, 약 10  $\mu\text{M}$ )으로 감소될 수 있다. 메티오닌의 양은 50  $\mu\text{M}$  미만(예를 들면, 약 30  $\mu\text{M}$ )으로 감소될 수 있다. S-아데노실 호모시스테인의 양은 0.14  $\mu\text{M}$  미만(예를 들면, 약 0.015  $\mu\text{M}$ )으로 감소될 수 있다.

[0015] 본원에서는 htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 대상체에서 간 질환을 치료하는 방법이 제공된다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 저분자량 또는 고분자량 PEG로 폐길화될 수 있다. 일부 실시형태에서, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 0.01 내지 10 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고 적어도 주 1회 투여될 수 있다. 예를 들면, 투여량은 약 0.4 mg/kg이다. htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 5 내지 7.5 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있고 적어도 주 2회 투여될 수 있다.

[0016] 본원 발명의 특정 실시형태는 서열번호 3의 아미노산 위치 15번에 돌연변이를 포함하는 단리된 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 호모시스틴뇨증을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 단리된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 ME-200GS PEG 분자로 폐길화된다.

[0017] 일부 실시형태에서, 돌연변이는 시스테인의 세린으로의 치환(C15S)이다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 조성물은 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위로부터 선택된 투여량으로 투여된다. 예를 들면, 투여량은 약 0.4 mg/kg이다.

[0018] 일부 실시형태에서, 질환, 장애 또는 병태는 골다공증, 탈모증, 머리숱 감소(thinning hair) 또는 안구 결함(eye defect)으로부터 선택되며, 상기 방법은 대상체에게 서열번호 3의 아미노산 위치 15번에 돌연변이를 포함하는 단리된 인간 절두형 시스타티오닌 베타 신타제(htCBS) 돌연변이 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여함을 포함하고, 여기서 상기 단리된 htCBS 폴리펩타이드 돌연변이체는 ME-200GS PEG 분자로 폐길화되었다.

[0019] 본 발명의 조성물 및 방법 등의 추가적 실시형태는 하기 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 자명할 것이다. 상기 및 하기 설명으로부터 알 수 있는 바와 같이, 본원에 설명된 각 특징 및 이러한 특징 2가지 이상의 모든 조합은, 이러한 조합에 포함된 특징들이 상호 불일치하지 않는 한 본 명세서의 범위 내에 포함된다. 또한, 임의의 특징 또는 특징들의 조합은 본 발명의 임의의 실시형태로부터 특징적으로 배제될 수도 있다. 본 발명의 추가적 측면 및 이점은, 특히 첨부된 실시예 및 도면과 함께 고려될 때 하기 상세한 설명 및 청구범위에 나타난다.

### 도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a 내지 도 1b는 혈장 및 생체내에서의 효소 체류를 도시한다. 도 1a는 혈장 중 효소 체류 시간이 유지됨을 도시하며, 이는 생체내에서의 빠른 활성 손실이 청소율(clearance)의 결과임을 시사한다. 도 1b는 생체내 효소 체류 시간이 폐길화된 htCBS의 경우에 증진되었음을 도시한다. 도 1b의 마우스 1번 및 마우스 2번은 국제 특허 공보 제WO2014120770호에 도 1B로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도 2는 폐길화되지 않은 htCBS의 반복 투여가 H0 마우스에서 호모시스테인 또는 시스타티오닌 수준의 변화를 야기하지 않음을 도시한다.

도 3은 ME200MAB로 명명된 선택된 선형 20kDa PEG 분자를 사용하였을 때의 폐길화 시간 코스를 도시한다.

도 4a 내지 4d는 폐길화된 htCBS의 장시간 반복된 주사가 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인 혈장 및 조직 수준에 유의적으로 영향을 준다는 것을 도시한다.

도 5a 내지 5h는 폐길화된 htCBS 돌연변이체(PEGC15S로서 또한 지칭됨) 및 폐길화된 htCBS가 단백질 응집을 방

지하고 주로 이량체를 형성하고 재현가능한 폐길화 패턴을 나타냄을 보여준다. 도 5a는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 5A로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 도 5b는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 5B로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 도 5c는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 5C로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 도 5f는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 6A로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 도 5g는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 7A 및 도 7B로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 도 5h는 국제 특허공보 제 W02014120770호에 도 6C로서 또한 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

도 6a 내지 6c는 주사 후 1시간, 4시간 및 24시간째에서의 호모시스테인 및 이의 대사산물에 미치는 폐길화된 htCBS 돌연변이체(PEGC15S로서 또한 지칭됨)의 효과를 도시한다.

도 7a 내지 7b는 폐길화된 htCBS 돌연변이체(PEGC15S로서 또한 지칭됨)와 베타인으로의 처리가 HO 마우스에서 호모시스테인 수준 및 시스타티오닌 수준에 대한 이의 효과를 상승작용적으로 감소시키고 호모시스테인 수준 및 시스타티오닌 수준에 대한 이의 효과를 낮게 유지시킴을 도시한다.

도 8a 내지 8b는 폐길화된 htCBS 돌연변이체(PEGC15S로서 또한 지칭됨) 투여가 CBS 완전한 녹아웃(knockout) 마우스를 조기 치사로부터 구제하며 간 병리상태를 개선시킴을 도시한다.

도 9a 내지 9b는 말레이미드 PEG 분자(ME-200MAOB 또는 ME-400MA) 또는 NHS 에스테르 PEG 분자(ME-200GS)로 폐길화된 C15S에 대한 상이한 폐길화된 종들의 프로파일을 도시한다.

도 10a 내지 10e는 20NHS PEG-htCBS C15S(ME-200GS PEG로 폐길화된 htCBS C15S) 또는 400MA PEG-htCBS C15S(ME-400MA PEG로 폐길화된 htCBS C15S)를 HO 마우스에게 단일 피하(SC) 주사한 후의 비활성 및 혈장 대사산물 수준과 CBS 활성을 도시한다.

도 11a 내지 11c는 ME-200GS, ME-200MAOB 또는 ME-400MA로 폐길화된 C15S를 투여한 후의 KO 마우스의 생존율 및 대사산물 수준의 변화를 도시한다.

도 12a 내지 12e는 ME-200MAOB, ME-400MA 또는 ME-200GS로 폐길화된 C15S가 연속적으로 투여된 I278T +/- 동형접합 마우스의 그룹들에서 안면 탈모증의 완전한 예방 및 이의 개시의 지연을 도시한다.

도 13a 내지 13b는 PBS-처리된 KO 마우스 및 건강한 대조 그룹과 비교하여 개선된 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 간 질환을 도시한다.

도 14a 내지 14b는 전자 현미경으로 관찰된 간 샘플을 도시한다.

도 15a 내지 15d는 HO 마우스에서 ALZET® 삼투 펌프의 상이한 모델들을 사용하여 연속적으로 투여된 20NHS PEG-htCBS C15S가 혈장 중 CBS 활성 및 황 아미노산 대사산물에 미치는 효과를 도시한다.

도 16a 내지 16g는 KO 마우스에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 연속적인 장기간 투여의 이중 에너지 X-선 흡광광도 분석법(DEXA 또는 DXA) 연구 결과를 도시한다.

도 17a 내지 17f는 I278T 마우스에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 연속적인 장기간 투여의 이중 에너지 X-선 흡광광도 분석법(DEXA 또는 DXA) 연구 결과를 도시한다.

도 18a 내지 18b는 20NHS PEG-htCBS C15S의 연속적인 장기간 투여 후에 I278T 마우스에서 NMR 대사체학을 사용하여 분석된 선택된 간 대사산물의 농도를 건강한 이형접합 대조 그룹 및 이환된 동형접합 대조 그룹과 비교하여 도시한다.

도 19a 내지 19e는 I278T 마우스에서 20NHS PEG-htCBS C15S 투여가 안구 결함에 미치는 효과를 도시한다.

도 20a 내지 20d는 20NHS PEG-htCBS로 처리되고 일반적 식이 또는 대사산물 제한 식이로 유지되는 I278T 마우스에서의 혈장 대사산물 수준을 도시한다.

도 21a 내지 21b는 4(IV) mg/kg, 8(SC) mg/kg 및 24(SC) mg/kg의 IV 또는 SC 볼루스(bolus) 투여 후 수컷 및 암컷 래트에서의 20NHS-htCBS C15S의 비활성을 도시한다. 도 21c는 8 mg/kg의 투여량으로 총 9회 주사가 투여되는 개개의 야생형 스프라그 다울리(Sprague Dawley) 래트에 대한 초기 주사 후 및 정상상태 수준에서의 20NHS PEG-htCBS C15S의 비활성을 도시한다.

도 22a 내지 22b는 2 mg/kg 또는 6 mg/kg의 투여량의 단일 IV 또는 SC 주사 후 야생형 시노물구스 원숭이(마카

카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))에서의 혈장 Cth 농도 및 20NHS PEG-htCBS C15S의 비활성을 도시한다.

도 23a 내지 23b는 1 mg/kg, 3 mg/kg 또는 10 mg/kg 투여량의 20NHS PEG-htCBS C15S를 다수회 SC 투여한 후 야생형 시노몰구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스)에서의 비활성 및 혈장 시스타티오닌(Cth) 수준을 도시한다.

도 24a 내지 24g는 본원의 마우스, 랫트 및 원숭이 모델의 결과에 기반하여 인간에서 20NHS PEG-htCBS의 유효 투여량을 추정하는 상대성장 스케일링 결과를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본원에서는 시스타티오닌 베타-신타제-결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 비제한적 예로서, CBSDH는 CBS 또는 이의 변이체의 효소 대체에 의해 치료될 수 있다.
- [0022] CBS의 불활성화는 전형적인 호모시스틴뇨증으로서 보다 흔히 지칭되는 시스타티오닌 베타-신타제-결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)을 야기한다. CBSDH는 현저하게 상승된 혈장 총 호모시스테인(tHcy) 및 메티오닌 수준과 크게 감소된 시스타티오닌 및 시스테인 농도를 특징으로 하는 상염색체 열성 장애이다; 이것은 가장 흔한 황-아미노산 결핍이다. 치료되지 않는다면, CBSDH는 각종 상이한 기관계에서 질환, 장애 및/또는 병태 및 심각한 표현형 변화를 유발한다. CBSDH로부터의 질환, 장애 및/또는 병태의 비제한적 예에는 정신 지체, 정신 장애(psychiatric disturbance), 발작을 포함하는 중추신경계 문제, 치료되지 않은 개체 및 부분 치료된 개체에서 높은 사망율을 야기하는 혈전색전성 합병증의 소인을 갖는 심혈관 질환 및 안구계(예를 들면, 진행성 근시 및 수정체 이탈, 수정체 편위) 및 골격계(예를 들면, 마르파노이드 체질, 골다공증, 척추측만증, 가는 금발 및 취약한 얇은 피부)에서 발생하는 광범위한 연결 조직 장애가 포함된다.
- [0023] CBSDH와 연관된 병원성 돌연변이의 성질에는 기능적 삼분(三分)이 존재한다. 하나의 돌연변이 그룹은 "피리독신-반응성"으로서 분류되고, 여기서 CBS 효소 기능은 고 투여량 비타민 B<sub>6</sub> 요법에 의해 부분적으로 복구될 수 있다. 이러한 치료는 효과적일 수 있으나, 이들 개체에서 병적 사건들을 항상 완화시키는 것은 아니며, 병적 사건들의 일부는 심지어 시간이 경과하면서 이들 개체에서 발생한다. 임상 환경에서 "비타민 B<sub>6</sub> 반응성"은 개체가 100 내지 500mg 경구 투여량의 B<sub>6</sub>를 투여받는지 24시간 후에 일어나는 Hcy의 20% 상대적 강하로서 정의되는데, 이는 B<sub>6</sub> 반응성 개체가 여전히 비정상적으로 높은 호모시스테인 수준을 가질 수 있음을 의미한다. 두번째 기능적 돌연변이 그룹은 S-아데노실메티오닌에 의한 번역후 상향조절에 반응하는 능력이 결여된 "C-말단 CBS 돌연변이체"로 대표된다. 이러한 부류의 돌연변이를 갖는 개체들은 통상적으로 정신 지체 및 표현형의 연결 조직 측면이 결여되어 있다. 이러한 부류는 40세 전에 특발성 혈전성 사건에 따른 혈장 Hcy 수준의 측정 후에 검출된다(참조: Maclean *et al.*, 2002, *Hum. Mutat.* 19:641-55). 마지막 CBSDH 돌연변이 그룹은 가장 중증 형태의 질환을 대표하는 "전형적인 호모시스틴뇨증"이다. 상기 마지막 두 그룹의 개체들의 경우, 비타민 B<sub>6</sub> 요법은 단독 투여량으로는 혈장 Hcy 수준을 효과적으로 저하시키지 않는다. 이들 돌연변이 그룹은 표현형 차이를 나타낼 수 있지만, 유사하게 치료될 수 있다.
- [0024] 가장 흔한 돌연변이된 CBS 대립유전자는 피리독신-반응성 호모시스틴뇨증과 연관된 833T>C(I278T)이다. 따라서, B<sub>6</sub> 반응성 개체가 호모시스틴뇨증 환자 집단의 절반을 차지한다(참조: Barber and Spaeth, 1969; Mudd *et al.*, 1985). 그러나, 이들 B<sub>6</sub> 반응성 개체 중에서 많은 개체가 단지 부분적 반응자이고, B<sub>6</sub> 비반응성 개체와 함께라면 추가적 치료 옵션에 대한 필요성이 발생한다. 불행하게도, 이러한 치료 옵션은 현재 시스테인(현재 필수적인)이 보충된 엄격한 저단백질 식이에 따름으로써 메티오닌 섭취를 감소시키고 호모시스테인을 다시 메티오닌으로 재메틸화시킬 수 있는 메틸 공여체인 베타인(N,N,N-트리메틸글리신)의 사용을 통해 호모시스테인 농도를 감소시키는 것으로 한정된다. 따라서, CBS(예를 들면, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS)를 이용한 효소 대체 요법(ERT)이 B<sub>6</sub> 부분적 반응성 환자와 비반응성 환자 둘 다를 위한 최상의 요법일 수 있다.
- [0025] CBS 기능장애의 결과로서, 호모시스테인(Hcy) 수준은 CBSDH 환자에서 급격하게 변경되어 있다. 건강한 개체에서, 총 Hcy 수준은 약 5 내지 15  $\mu$ M의 범위이며(참조: Stabler *et al.*, 2002, *Metabolism*, 51:981-988), 이중 98%는 디설파이드의 형태이거나 단백질-결합형이다. tHcy의 오직 2%만이 CBS에 대한 기질로서 작용할 수 있는 유리(단백질 비-결합된) 환원된 호모시스테인으로서 존재한다(참조: Mansoor *et al.*, 1992, *Anal. Biochem.* 200:218-229; Mudd *et al.*, 2000, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1704-1706). 이러한 균형은 CBSDH 환자에서 급격하게 변경되며, tHcy 값(약 400  $\mu$ M 이하)의 10 내지 25%에 달하는 유리 환원된 호모시스테인이 이들 환자에서 관찰된다(참조: Mansoor *et al.*, 1993, *Metabolism*, 42:1481-1485).



- [0026] 보다 높은 tHcy 수준(예를 들면, 야생형 수준보다 54배 더 큰)은 또한 마우스에서 안면 탈모증, 골다공증 및 평균 생존율의 감소와 같으나 이에 한정되지 않는 질환, 장애 및/또는 병태를 유발할 수 있다. 비제한적 예로서, tHcy가 야생형과 비교하여 적어도 54배 더 높은 모델 마우스는 안면 탈모증, 골다공증 및 평균 생존율의 감소를 포함하는 몇몇 질환, 장애 및/또는 병태를 나타냈다. 그러나, tHcy 수준이 정상 값의 약 30배인 마우스에서는 이러한 징후가 관찰되지 않았고 따라서 호모시스테인 상승은 단지 역치 수준을 초과할 때에만 병원성일 수 있다(참조: Gupta *et al.*, 2009, *FASEB J.* 23:883-893). 인간에서의 CBSDH의 다기관 관찰 연구에서, 심지어 다양한 치료 병용도 CBSDH 환자에서 정상 호모시스테인 수준을 복구시키는데 실패하였고 B<sub>6</sub> 비반응자는 정상 집단에서의 상한치보다 3배 내지 5배 더 높은 호모시스테인 수준을 지속적으로 나타낸 것으로 밝혀졌지만, 이들 환자의 혈전색전증 위험은 현저하게 감소되었다(참조: Yap *et al.*, 2001, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 2080-2085). 종합하면, 이들 데이터는, CBSDH의 임상적 표출(clinical manifestation)을 개선하기 위해서 tHcy가 역치 수준 미만이라면 tHcy의 불완전한 감소라도 질환을 치료하기에 충분할 수 있음을 나타낸다.
- [0027] 저 메티오닌 식이는 환자에서 호모시스테인 수준의 일부 대사적 제어를 확립하고 유지하는데 있어 효과적일 수 있지만, 이의 효과는 특히 늦게 진단 받은 환자에서 규정식 준수의 결여에 의해 방해될 수 있어서, 특히 아동에서 증상 발달을 동반한 호모시스테인의 부수적인 증가를 야기한다(참조: Walter *et al.*, 1998, *Eur. J. Pediatr.* 157 Suppl 2, S71-76). 규정식 준수의 실패는 혈청 Hcy 증가, 치명적인 무능화 사건을 포함하는 혈관 조직 및 연결 조직에서의 합병증 재발 및 뇌부종(과도한 혈청 Met 농도로 인한) 또는 심각한 영양실조(필수 아미노산 부족으로 인한)와 같은 심각한 부작용의 위험을 유발한다. 가장 효과적인 치료 전략은 비타민 B<sub>6</sub> 반응성 호모시스틴뇨증 환자에게 피리독신이 제공되었을 때에 자명한 바와 같이 효소 활성을 증가시키는 것이다. 이러한 전략은 돌연변이 상황으로 인해 비타민 B<sub>6</sub> 비반응성 개체에서는 불가능할 수 있다. 베타인은 덜 순응성인 환자에서 대사적 제어를 달성하는데 도움이 될 수 있으며, 베타인과 식이의 병용은 이용가능한 최상의 치료를 대표할 수 있다. 그러나, B<sub>6</sub> 비반응자를 위한 현재의 요법은 시스타티오닌을 증가시키지 않으며, 시스테인 보충은 적절한 수준을 유지하는 것을 보장할 수 있다. 따라서, 이들 개체에서 증가된 효소 활성은 외인성 효소의 전달, 즉 효소 대체 요법(ERT)에 따라 좌우된다.
- [0028] 상당한 증거들이 황전이에서 중간체로서의 시스타티오닌의 역할과는 관계없는 시스타티오닌에 대한 가능한 기능을 제시하고 있다. 시스타티오닌의 긍정적인 역할은 CBS-결핍 호모시스틴뇨증의 특정 트랜스제닉 마우스 모델의 연구에 의해 제시되었다. 상기 전형적인 호모시스틴뇨증 모델에서, 마우스 *cbs* 유전자는 불활성화되어 있고 인간 CBS 프로모터의 제어하의 인간 CBS 전이유전자(transgene)의 저수준 발현에서 생존한다; 따라서, 상기 마우스는 "인간 단독(human only)"(HO)으로서 지정되었다. HO 마우스는 Hcy, 메티오닌, S-아데노실메티오닌 및 S-아데노실호모시스테인의 혈장 수준과 조직 수준 둘 다의 심각한 상승 및 시스테인의 혈장 수준과 간 수준의 부수적인 감소를 나타낸다. 그러나, 심각한 성장 지연 및 간병증을 앓고 간지방증, 섬유증이 발생하고 어미 마우스가 베타인으로 처리되는 동안에도 출생 후 3주 이내의 신생아 사망이 발생하는 이전의 전통적인 호모시스틴뇨증 CBS 녹아웃 모델(중증 성장 지연 및 간병증을 앓고 어미 마우스가 베타인을 복용하는 동안에도 대부분이 출생 후 3주 이내에 사망하는 CBS 녹아웃 마우스(KO)로서도 공지되어 있음)(참조: Maclean *et al.*, 2010b, *Mol. Genet. Metab.* 101, 153-162))과 대조적으로, HO 마우스는 경미한 간병증을 나타내고, HO 마우스의 약 90%는 적어도 6개월 동안 생존한다(참조: Maclean *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.* 287, 31994-32005, 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 꼬리 채혈 측정은 HO 마우스가 과다응고성(hypercoagulable) 상태에 있음을 나타내고, 이러한 과다응고성 상태는 인간에서 발생하는 질환을 재현하는 방식으로 베타인 처리에 의해 유의적으로 개선된다(참조: Maclean *et al.*, 2010b, *Mol. Genet. Metab.* 101, 153-162; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). HO 마우스는 높은 수준의 tHcy를 갖지만 오직 경미한 결과만을 겪는다. KO(약 1  $\mu$ M)와 비교해 HO 마우스(약 10  $\mu$ M)에서 현저하게 상승되어 있는 시스타티오닌의 수준을 제외하고는, 이들 두 모델 간에 대사산물 수준의 차이는 거의 없다. 따라서, 시스타티오닌은 간 및 신장 지질 축적, 조직 손상, 및 연장된 소포체 스트레스에 의해 유도된 아포토시스 세포사(apoptotic cell death)에 대한 보호 효과를 발휘할 수 있다고 제시되었다.
- [0029] 시스타티오닌은 시스테인 프로드럭을 제공함으로써 아세트아미노펜-유도된 간 손상의 마우스 모델에서 보호 효과를 발휘할 수 있다. 시스타티오닌의 시스테인으로의 전환을 차단함으로써 고시스타티온혈증(hypercystathionemia)을 유도하는 실험에서 CGL 불활성화 화합물 D,1-2-아미노-4-펜탄산의 사용은, 시스타티오닌이 이러한 화합물을 시스테인으로 전환시킬 수 없는 23 세포에서 유의적인 보호 효과를 발휘한다는 관찰결과와 결부되어, 관찰된 보호 효과가 시스타티오닌이 시스테인 합성의 전구체로서 작용한 결과가 아님을 나타낸다.

- [0030] 시스타티오닌은 뇌를 정상적으로 기능시키는데 중요할 수 있다. 시스타티오닌이 특히 정상 포유동물 뇌에 축적되어 세포보호제로서 작용하고 이의 합성의 소실이 상승된 Hcy 및/또는 이의 유도체의 독성 자극에 대한 신경 조직의 민감도를 증가시킴으로써 호모시스틴뇨증 환자에서의 정신 지체에 기여할 수 있다는 것은 가능하다(참조: Maclean *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.* 287, 31994-32005). 뇌 내 시스타티오닌 농도에 있어 상당한 영역적 차이가 있으며, 회색질보다 백색질에서 농도가 더 높는데, 이는 수초화에서의 가능한 역할을 시사한다. 시스타티오닌은 하등 동물 종의 전체 뇌보다 인간 및 원숭이 뇌의 후두엽에서 보다 높은 수준으로 발견되었으며, 시스타티오닌의 역할은 설치류 뇌보다 영장류에서 더 중요한 것으로 제시되었다(참조: Volpe and Laster, 1972, *Biol. Neonate* 20, 385-403; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다).
- [0031] 수많은 간접적 증거들이 시스타티오닌 또는 이의 유도체의 가능한 생리학적 역할을 뒷받침하고 있다. 영장류 뇌 및 중추신경계(CNS)에서는 CBS와 CGL의 상대적 활성 수준 간에 불균형이 있어서 시스타티오닌 축적을 초래하는 것으로 보인다. 유사하게, 배아 발달 동안 CBS는 성체 조직에서는 어떠한 검출가능한 CBS도 발현하지 않는 심장 및 폐와 같은 다수의 조직에서 발현된다. 다양한 데이터는 CGL이 초기 포유동물 발달 동안 발현되지 않음을 나타낸다. 예를 들면, 인간 간 샘플에서, CGL 활성은 오직 출생후 조직에서만 검출되는 반면에, 태아, 조숙아 및 만기 신생아 간 조직에서의 활성은 근본적으로 검출 불가능하다. 종합하면, 이러한 결과들은, 특정 발달 단계에서 그리고 성체 신경 조직에서 CBS가 시스테인 합성의 중간체로서 이의 역할과는 별개로 시스타티오닌 생산을 위해 특이적으로 발현됨을 나타낸다(참조: Maclean *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.* 287, 31994-32005; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 포유동물 발달 동안 시스타티오닌  $\gamma$ -리아제(CGL) 및 CBS 발현에 대한 철저한 제어가 일어난다는 지식과 함께, 이러한 관찰결과들은 모두 종합되어 시스테인에 대한 전구체인 것 외에도 시스타티오닌의 가능한 보호 역할을 제시한다.
- [0032] 시스타티오닌으로부터 시스테인 생합성은 CGL에 의해 촉매된다. 시스타티오닌은 세포 내부에 존재하고, 혈장 단백질로서 존재하지 않는다고 믿어진다. 따라서, 본원에 기재된 폐결화된 인간 절두형(htCBS) 효소의 주사시 생산되는 시스타티오닌은 CGL의 세포내 기질로서 또한 작용할 수 있을 것으로 믿어진다. 게다가, 감소된 tHcy 수준은 시스테인-호모시스테인 부가물(이는 소변으로 신속하게 청소(clear)될 수 있다)의 형성을 방해하여 혈장 중에 보다 높은 수준의 유리 시스테인을 생성시킬 수 있다(참조: Gupta *et al.*, 2014, *FASEB J.* 28:781-790).
- [0033] 이제 본 발명의 다양한 측면들을 이하에서 보다 충분히 설명할 것이다. 그러나, 이러한 측면들은 많은 상이한 형태들로 구현될 수 있고, 본원에 제시된 실시형태들로 한정되는 것으로 해석되지 않아야 한다; 오히려, 이러한 실시형태들은 본 명세서가 철저하고 완전해질 수 있고 당업자들에게 본 발명의 범위를 충분히 전달할 수 있도록 하기 위해 제공된다.
- [0034] **CBS 효소**
- [0035] CBS 유전자는 인간 21번 염색체상에서 q22.3에 존재한다(참조: Skovby *et al.*, *Hum. Genet.* 65:291-294 (1984); Munke *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 42:550-559 (1988); 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 인간 CBS를 암호화하는 핵산 서열 및 이에 의해 암호화되는 아미노산 서열은 진뱅크(GenBank) 수탁번호 L19501를 통해 입수가능하며 이들 서열은 미국 특허 제5,523,225호(이는 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)에 또한 개시되어 있다. CBS를 암호화하는 게놈 DNA의 핵산 서열도 또한 진뱅크 및 콜로라도대학교 덴버캠퍼스 웹페이지(Kraus Laboratory)와 같은 서열 데이터베이스를 통해 공개적으로 입수가능하다.
- [0036] 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, CBS 유전자에 의해 암호화되는 단백질은 황전이 경로의 첫번째 단계인 호모시스테인의 시스타티오닌으로의 전환을 촉매하는 동중사량체로서 작용한다. 상기 암호화된 단백질은 S-아데노실-메티오닌에 의해 알로스테릭(allosteric) 방식으로 활성화되고 보조인자로서 피리독살 포스페이트를 사용한다. 상기 유전자에 대한 다수의 교호적으로 스플라이싱된(spliced) 전사 변이체들이 발견되었다.
- [0037] CBS는 메틸기전이, 황전이 및 재메틸화 경로의 교차지점에서 작동함으로써 메티오닌에서 시스테인으로의 황의 일방향성 흐름을 통제한다. CBS는, 세린이 피리독살 5'-포스페이트(PLP)-의존적 방식으로 호모시스테인과 축합하여 시스타티오닌을 형성하는  $\beta$ -치환 반응을 촉매한다(참조: Miles and Kraus, 2004, *J. Biol. Chem.* 279:29871-29874; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 그 다음, 시스타티오닌은 시스타티오닌 감마 리아제(CGL)에 의해 시스테인으로 전환될 수 있다. 따라서, CBS 효소의 적절한 기능은 시스테인 및 메티오닌 대사 둘 다의 조절에 매우 중요하고(참조: Mudd *et al.*, 2001, "Disorders of Transsulfuration." In the *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. C.R. Scriver, A.L. Beudet, W.S. Sly, V. D., C. B., K.K. W., and V. B., eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 2007-2056; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다), 따라서, 손상된 CBS 활성 또는 이의 부족은 CBS-결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)의 생화학적 및 임상적



표출을 초래한다.

- [0038] CBS의 불활성화는 보다 흔히 전형적인 호모시스틴뇨증으로서 지칭되는 시스타티오닌 베타-신타제-결핍 호모시스틴뇨증(CBSDH)을 야기한다. 전형적인 호모시스틴뇨증은 1962년에 칼슨(Carson)과 닐(Neill)에 의해 최초로 설명되었으며(참조: Carson and Neill, 1962, *Arch. Dis. Child* 37:505-513; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다), 황 아미노산 대사작용의 가장 흔한 선천성 이상으로서 인식되고 있다. 시스타티오닌  $\beta$ -신타제(CBS) 효소의 결핍인 호모시스틴뇨증의 근본적 원인은 바로 그 후에 발견되었다(참조: Mudd *et al.*, 1964, *Science* 143:1443-1445; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다).
- [0039] 미스센스 돌연변이들은 시스타티오닌  $\beta$ -신타제(CBS) 결핍의 가장 흔한 원인을 대표한다. 이들 돌연변이들 중 다수는 생물학적 기능이 결여된 미스폴딩된(misfolded) 단백질을 야기한다. 화학적 샤페론(chaperone)(예를 들면, 에탄올, 디페닐 설펜사이드 또는 트리메틸아민-N-옥사이드와 같은)의 존재는 때때로 돌연변이체 단백질의 단백질 폴딩 및 활성을 개선시키거나 심지어 복구시킨다. 8가지의 CBS 돌연변이체 효소(P49L, P78R, A114V, R125Q, E176K, P422L, I435T 및 S466L)가 정제되고 특징 규명되었으며 이들의 단백질 폴딩을 개선시킴으로써 화학적 샤페론으로 구제될 수 있었다. 헴으로 완전 포화된 사랑체 돌연변이체 효소는 야생형 CBS와 동일하거나 이보다 더 높은 비활성을 가졌다. 열 안정성 측정은 정제된 돌연변이체가 야생형 CBS와 동일하거나 이보다 더 열 안정성을 입증하였다. S-아데노실-L-메티오닌 자극 또는 열 활성화에 대한 반응은 다양하였다. 두 자극 모두에 대한 R125Q 및 E176K의 반응 부족은 이들의 특이적 입체구조가 활성화된 상태에 도달할 수 없었음을 나타냈다. 조 추출물, 특히 DnaJ 중의 증가된 분자성 샤페론 수준은 CBS 돌연변이체의 폴딩에 미치는 화학적 샤페론의 다소 간접적인 효과를 나타냈다(참조: Majtan, *et al.*, 2010, *J. Biol. Chem.* 285(21): 15866-15873; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다).
- [0040] 이. 콜라이(*E. coli*)에서 이전에 시험된 27 CBS 돌연변이의 미스폴딩 정도는 포유동물 CHO-K1 세포의 보다 폴딩-허용성인 조건하에 이들 돌연변이의 입체구조를 구제하는 샤페론의 능력에 대해 시험되었다. 포유동물 세포에서의 돌연변이 발현은 세균에서의 발현과 비교하여 활성 중앙값을 16배 증가시켰으며 사랑체의 양을 3.2배 증가시켰다. 후속적으로, 샤페론-유사 활성을 갖는 3가지 화합물에 대한 7가지 선택된 돌연변이들의 반응을 시험하였다. 아미노옥시아세트산 및 4-페닐부티르산은 오직 약한 효과만을 나타냈다. 대조적으로, 헴 알기네이트는 후속적으로 돌연변이체 CBS 단백질 사랑체의 형성을 증가시켰으며(최대 6배까지) 7가지 돌연변이 중 5가지(p.A114V, p.K102N, p.R125Q, p.R266K 및 p.R369C)의 촉매 활성을 구제하였다(최대 9배까지). 헴 알기네이트의 가장 큰 효과는 생체내 비타민 B6 처리에 대해 비반응성인 돌연변이 p.R125Q에 대해 관찰되었다. 게다가, p.R125Q 돌연변이의 헴 반응성은 이러한 유전적 변이체에 대해 동형접합인 환자로부터 유래된 섬유아세포에서 확인되었다. 이들 데이터에 기반하여, 별개의 헴-반응성 CBS 돌연변이 그룹이 제안되었으며, CBS의 헴 포켓은 호모시스틴뇨증을 위한 신규 요법을 디자인하는데 있어 중요한 표적인 것으로 예측되었다(참조: Melenovska, *et al.*, 2014, *J. Inherit. Metab. Dis.* 38(2); 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다).
- [0041] 생화학적으로, CBSDH는 낮은 시스테인 및 시스타티오닌 수준을 동반한 고도로 상승된 혈중 호모시스테인, 메티오닌 및 S-아데노실-호모시스테인("SAH" 또는 "AdoHcy"로서도 공지됨) 수준을 특징으로 한다. 치료되지 않은 호모시스틴뇨증의 일부 임상적 표출에는 혈전색전증, 안구 수정체 이탈, 마르파노이드 체질 및 골다공증과 같은 연결 조직 문제, 인지 손상 및 기타 징후들이 포함된다(참조: Kraus, J., and Kozich, V. (2001). "Cystathionine beta-synthase and its deficiency." In Homocysteine in health and disease. J.D. Carmel R, ed. (New York: Cambridge University Press), pp. 223-243; Mudd *et al.*, 2001, "Disorders of Transsulfuration." In the Metabolic and molecular bases of inherited disease. C.R. Scriver, A.L. Beudet, W.S. Sly, V. D., C. B., K.K. W., and V. B., eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 2007-2056).
- [0042] 호모시스틴뇨증을 치료하려는 초기의 시도들은 메티오닌 섭취를 감소시키는 식이 제한을 이용함으로써 독성 호모시스테인의 축적을 회피하였다(참조: Komrower *et al.*, 1966, *Arch. Dis. Child* 41:666-671). 이후에 PLP-보조인자 전구체인 피리독신(비타민 B<sub>6</sub>) 보충이 절반이 약간 안되는 환자들의 임상적 표출을 완화시키고 이들 환자의 서브세트가 오직 부분적 반응자라는 것이 밝혀졌다(참조: Barber and Spaeth, 1969, *J. Pediatr.* 75:463-478; Mudd *et al.*, 1985, *Am. J. Hum. Genet.* 37:1-31). "B<sub>6</sub> 반응자"는 이들의 남은 일생 동안 보충적 B<sub>6</sub>를 섭취할 필요가 있다. 많은 사례에서, 심지어 완전한 B<sub>6</sub>-반응성 환자라도 대사적 제어를 달성할 수 있기 위해 약간의 단백질 제한 식이를 필요로 한다(참조: Picker, J.D., and Levy, H.L. (2004). Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency. In GeneReviews. R.A. Pagon, M.P. Adam, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.T. Fong, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 상기 문헌들 각각의

내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 나머지 서브세트인 비반응자는 극도로 제한된 식이의 대상이 되며, 이중 많은 환자들이 잘 준수하지 못한다(참조: Walter *et al.*, 1998, *Eur. J. Pediatr.* 157 Suppl 2, S71-76; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 식이는 효소 베타인-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제(BHMT)에 대한 메틸 공여체로서 작용하여 호모시스테인으로부터 디메틸글리신 및 메티오닌을 생성할 수 있는 베타인과 함께 메티오닌-비함유 및 시스테인 강화된 아미노산 혼합물과 병용된다(참조: Finkelstein, 1990, *J. Nutr. Biochem.* 1:228-237). 글루타티온은 시스테인으로부터 합성되고 따라서 시스테인 첨가는 산화적 스트레스를 감소시키는데 중요할 수 있다. 대부분의 환자들은 또한 트리메틸글리신 및 통상적 투여량의 엽산 보충제로 처리된다. 이는 엄격한 식이와 연합되어, 호모시스테인 수준을 저하시켜 대사적 제어를 개선시킨다.

[0043] 베타인(N,N,N-트리메틸글리신)은 호모시스테인이 다시 메티오닌으로 전환되는 것을 촉진함으로써, 즉 폴레이트 유도체(이는 주로 간 및 신장에서 활성적이다)와 독립적인 재메틸화 경로를 통한 흐름을 증가시킴으로써 호모시스테인의 농도를 감소시키는데 사용된다. 그 다음, 재형성된 메티오닌의 적은 일부는 신체 단백질로 통합됨으로써 점차 제거된다. 단백질로 전환되지 않은 메티오닌은 S-아데노실-메티오닌으로 전환되고, S-아데노실-메티오닌은 이어서 호모시스테인을 다시 형성하기 시작한다. 따라서, 베타인은 제거될 메티오닌의 양이 적을 경우에 가장 효과적일 수 있다. 따라서, 치료는 베타인과 저 메티오닌 식이 둘 다를 포함한다. 전형적인 호모시스테인뇨증에서, 혈장 메티오닌 수준은 통상적으로 30 마이크로몰/L의 정상 범위를 상회하여 증가하고, 잠재적으로 독성인 수준(400 마이크로몰/L 초과)에 도달될 수 있기 때문에 그 농도는 모니터링되어야 한다.

[0044] B<sub>6</sub> 비반응자 및 부분적 반응자에게 대사 이상을 개선하고 순환계내 독성 호모시스테인 축적을 감소시키고 시스타티오닌 및 시스테인의 수준을 증가시키는 용법을 제공하기 위해 CBSDH에 대한 대안적 치료 전략이 오랫동안 모색되어 왔다. 이러한 대사적 변화는 CBSDH 증상을 역전시키거나 이의 개시를 지연시킬 수 있고 이러한 이환된 개체의 그룹이 비제한 또는 오직 약간만 제한된 식이를 섭취할 수 있게 하고 개체들의 삶의 질을 현저하게 개선시킨다. 이러한 혜택을 제공하기 위해, 요법은 이러한 병태, 즉 비정상적 CBS 수준 및/또는 기능에서 근본이 되는 핵심적 결핍을 개선시켜야 한다. 따라서, CBS를 효소 대체 요법(ERT)의 형태로 전신 도입하는 것이 호모시스테인뇨증 환자를 위해 유익할 수 있다.

[0045] 이론에 결부되지 않고, CBS 투여로 인한 세포의 호모시스테인의 유의적 감소는 농도 구배를 생성시켜 세포내 공간으로부터 세포외 공간으로의 호모시스테인 흐름을 촉발하고, 여기서 투여된 효소는 이를 추가 프로세싱하고 따라서 세포외 CBS가 호모시스테인 "싱크(sink)"로서 작용할 수 있는 것으로 믿어진다.

[0046] 4개의 동일한 단량체들로 구성된 사량체로서 존재하는 본래의 인간 CBS의 구조 및 활성화 방식은 ERT로서 사용하기가 어려울 수 있다. 상기 형태의 효소는 높은 응집 경향을 갖고 이는 정제 작업에 큰 제약이 된다(참조: Kraus and Rosenberg, 1983, *Arch. Biochem. Biophys.* 222:44-52; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 게다가, CBS 활성화는, 효소의 C-말단 조절 영역에 의해 효소에 가해지는 자가-저해를 완화시키기 위해 C-말단 테일에는 S-아데노실-메티오닌(SAM)의 결합을 필요로 한다.

[0047] C-말단 조절 영역이 제거된 절두형 재조합 인간 CBS(htCBS)가 제공된다(서열번호 3). 한 실시형태에서, htCBS는 돌연변이될 수 있는데 여기서 아미노산 위치 15번의 시스테인이 세린으로 변경되었다(htCBS 돌연변이체 또는 C15S)(서열번호 13).

[0048] 한 실시형태에서, 폐결화된 htCBS 또는 폐결화된 htCBS 돌연변이체 효소는 생체내에서 효소의 약동학적 및 약력학적 특성들을 개선시켰다. 치료학적 단백질은 소분자와 달리 비경구 경로를 통해 전달되고, 치료 효능은 이의 흡수, 분포, 대사작용 및 배출("ADME")에 의해 크게 영향을 받을 수 있다(참조: Vugmeyster *et al.*, 2012, *World Journal of Biological Chemistry* 3:73-92; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다). 효소와 같은 고분자량 화합물은 제한된 조직 투과 성능을 가지며 따라서 적어도 하나의 기전에 의해 순환으로부터 제거될 때까지 주로 혈장 중에 존재한다.

[0049] 한 실시형태에서, ERT를 위한 htCBS 또는 htCBS 돌연변이체의 투여는 황 아미노산 대사작용에 대한 일정하고 유의적인 효과를 전달하기에 충분한 기간 동안 혈장에서 높은 활성을 유지시킨다. ERT 효능의 증진은 생체내 체류 시간을 증가시키기 위해 단백질의 추가 변형을 필요로 할 수 있다. 이는 대상체에서 체류 시간을 연장하기 위한 폐결화, 즉 단백질 표면으로의 폴리-에틸렌-글리콜(PEG) 모이어티 첨가에 의해 달성될 수 있다. 폐결화는 단백질 안정성 및 크기를 증가시키고 신장 배출을 감소시키면서 단백질분해, 면역반응 및 항원성을 최소화하는 것으로 확인되었다(참조: Kang *et al.*, 2009, *Expert opinion on emerging drugs* 14:363-380; 이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다).

- [0050] 시스타티오닌으로부터의 시스테인 생합성은 오로지 CGL에 의해서만 촉매된다. 시스타티오닌은 오직 세포 내부에만 존재하고 혈장 단백질로서 존재하지 않는다. 따라서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소의 주사시 생산되는 시스타티오닌은 CGL의 세포내 기질로서 또한 작용할 수 있을 것으로 믿어진다. 추가로 그리고 상호 배타적이지 않게, 최근에 제시된 바와 같이, 감소된 tHcy 수준은 시스테인-호모시스테인 부가물(이는 소변으로 신속하게 청소될 수 있다)의 형성을 방해하여 혈장 중에 보다 높은 수준의 유리 시스테인을 생성시킬 수 있다(참조: Gupta *et al.*, 2014, *FASEB J.* 28, 781-790). 시스테인 보충 없이 시스테인 수준을 정상화시키는 것은 본원에 기재된 ERT에서의 htCBS 및 htCBS 돌연변이체의 다른 잠재적 이점이다.
- [0051] 한 실시형태에서, 시스테인 수준의 정상화는 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소의 투여 후에 관찰될 수 있다. 대사산물 수준의 변화 외에도, htCBS 또는 htCBS 돌연변이체 투여의 또 다른 긍정적 효과는 이환된 CBSDH 환자의 간 질환 및 생존율에 유의적인 영향을 미칠 것으로 예측될 수 있다.
- [0052] **폐길화된 htCBS의 사용 방법**
- [0053] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 CBSDH를 치료하는데 사용될 수 있다. CBSDH와 연관된 3가지 병원성 돌연변이 그룹, (1) 피리독신-반응성 돌연변이, (2) C-말단 CBS 돌연변이체 및 (3) 전형적인 호모시스틴뇨증이 있다.
- [0054] 한 실시형태에서, htCBS 및 htCBS 돌연변이체 효소 대체는 CBSDH를 치료하기 위해 사용될 수 있다. htCBS 및 htCBS 돌연변이체 효소는 당업계에 공지되어 있거나 본원에 기재된 방법에 의해 폐길화될 수 있다. 비제한적 예로서, PEG는 저분자량(예를 들면, 2 kDa) PEG 또는 고분자량(예를 들면, 40 kDa) 4개의 암(arm) 분지형 PEG일 수 있다. 예를 들면, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 하기 PEG 분자들 중 하나로 폐길화된다: ME-200MAOB, ME-400MA, ME-050GS, GL4-400MA 및 ME-200GS. 예를 들면, htCBS 또는 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드 PEG 접합체는 20NHS PEG-htCBS C15S 접합체이다.
- [0055] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 및 상기 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 사용 방법은 피리독신-반응성 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 피리독신-반응성 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 단독으로 사용되거나 현재의 요법(예를 들면, 비타민 B6 또는 베타인)과 병용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 피리독신-반응성 돌연변이를 갖는 대상체에서 병리학적인 사건을 경감시키거나 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 부분적 반응자인 피리독신-반응성 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 비반응자인 피리독신-반응성 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0056] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 및 상기 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 사용 방법은 C-말단 CBS 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 C-말단 CBS 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 단독으로 사용되거나 현재의 요법(예를 들면, 비타민 B6 또는 베타인)과 병용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 C-말단 CBS 돌연변이를 갖는 대상체에서 혈청 Hcy 수준을 저하시키기 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 부분적 반응자인 C-말단 CBS 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 비반응자인 C-말단 CBS 돌연변이를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0057] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 및 상기 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 사용 방법은 전형적인 호모시스틴뇨증을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 전형적인 호모시스틴뇨증을 갖는 대상체를 치료하기 위해 단독으로 사용되거나 현재의 요법(예를 들면, 비타민 B6 또는 베타인)과 병용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 부분적 반응자인 전형적인 호모시스틴뇨증을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 전형적인 호모시스틴뇨증을 갖는 대상체에서 혈청 Hcy 수준을 낮추기 위해 사용될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비타민 B6 요법에 대해 비반응자인 전형적인 호모시스틴뇨증을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 인간, 래트, 마우스 및 비인간 영장류이다. 특정 실시형태에서, 20NHS PEG-htCBS C15S는 골다공증, 머리술 감소



또는 안구 결함으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 질환, 장애, 병태 또는 임상적 증상을 치료하기 위해 사용된다.

- [0058] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 CBSDH와 연관된 증상, 질환 또는 장애를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 증상, 질환 또는 장애는 기관계에 존재하거나 심각한 표현형 변화일 수 있다. CBSDH로부터의 질환, 장애 및/또는 병태의 비제한적 예에는 정신 지체, 정신 장애(psychiatric disturbance), 발작을 포함하는 중추신경계 문제, 치료되지 않은 개체 및 부분 치료된 개체에서 높은 사망율을 야기하는 혈전색전성 합병증의 소인을 갖는 심혈관 질환 및 안구계(예를 들면, 진행성 근시 및 수정체 이탈, 수정체 편위) 및 골격계(예를 들면, 마르파노이드 체질, 골다공증, 척추측만증, 가는 금발 및 취약한 얇은 피부)에서 발생하는 광범위한 연결 조직 장애가 포함된다.
- [0059] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 혈전색전증, 안구 수정체 이탈, 마르파노이드 체질 및 골다공증과 같은 연결 조직 문제, 및 인지 손상과 같으나 이에 한정되지 않는 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0060] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소는 간 질환의 효과를 감소시키고/시키거나 간 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 간 질환은 CBSDH를 갖는 대상체내에 있을 수 있다. 따라서 간 질환의 치료 및/또는 간 질환의 효과의 감소는 CBSDH 환자의 생존율을 증가시킬 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 간 실질(liver parenchyma)의 손상을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0061] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 시스타티오닌을 증가시키고 간 질환 또는 손상을 치료하거나 또는 이의 효과를 감소시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0062] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소를 이용하는 본원에 기재된 조성물 및 방법(예를 들면, 효소 대체 요법(ERT))은 호모시스틴뇨증의 특징이 되는 질환 표출(disease manifestation) 및 대사 이상을 개선시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소는 적어도 24시간, 적어도 48시간 또는 적어도 72시간 동안 독성 대사산물을 조정할 수 있다. 추가 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소는 적어도 3개월, 6개월, 12개월 또는 24개월 동안 질환 표출을 개선시킨다.
- [0063] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체 효소를 이용한 ERT는 호모시스틴뇨증을 예방 및 치료할 수 있도록 하고/하거나 호모시스틴뇨증의 증상을 개선시킬 수 있도록 하고 이러한 엄격한 단백질-배제 식이를 유지해야 할 필요를 완화시키는 CBSDH 환자를 위한 효과적 요법을 제공한다. 대안으로, 대상체에게 폐길화된 htCBS C15S가 투여되며, 대상체는 단백질-배제 또는 Met-제한 식이를 섭취 중이다.
- [0064] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 시스타티오닌을 증가시키고 호모시스틴뇨증 대상체에서 정신 지체를 치료하거나 정신 지체의 효과를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 시스타티오닌의 양은 후두엽 회색질 및 백색질과 같으나 이에 한정되지 않는 영역 또는 부위에서 증가될 수 있다.
- [0065] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 호모시스틴뇨증 대상체의 뇌 속의 신경 조직의 민감성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 시스타티오닌의 양은 후두엽 회색질 및 백색질과 같으나 이에 한정되지 않는 영역 또는 부위에서 증가될 수 있다.
- [0066] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 CBSDH를 갖는 대상체의 수명을 연장시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0067] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 호모시스틴뇨증 치료를 위한 CBS 효소 대체 요법(ERT)의 일부분으로서 사용된다. 폐길화된 htCBS 및 htCBS 돌연변이체의 투여는 결핍 효소의 천연 세포 내 구획으로의 도입을 필요로 하지 않을 수 있다.
- [0068] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 투여는 호모시스테인 수준을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 67%, 69%, 70%, 74%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 95% 초과만큼 감소시킨다. 비제한적 예로서, 호모시스테인의 감소는 약 69%의 감소일 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인의 감소는 약 67%의 감소일 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인의 감소는 약 52%의 감소일 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인의 감소는 약 33%의 감소일 수 있다.
- [0069] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 종래의 베타인 치료 전, 치료 후 또는 치

료와 동시에 투여될 수 있다. 병용 요법은 호모시스테인 수준에 대해 상승 효과를 초래할 수 있다.

- [0070] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체를 대상체에게 투여하여 황 아미노산의 세포 외 및 세포내 평형을 변경할 수 있다.
- [0071] 한 실시형태에서, 세포외 및 세포내 평형의 변경은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 67%, 69%, 70%, 74%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 95% 초과와 같으나 이에 한정되지 않는 혈장 호모시스테인의 감소일 수 있다. 비제한적 예로서, 혈장 호모시스테인의 감소는 약 75%의 감소일 수 있다.
- [0072] 한 실시형태에서, 세포외 및 세포내 평형의 변경은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 1120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%, 710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000% 또는 1000% 초과와 같으나 이에 한정되지 않는 시스타티오닌의 증가일 수 있다. 비제한적 예로서, 시스타티오닌의 증가는 약 900%일 수 있다.
- [0073] 한 실시형태에서, 세포외 및 세포내 평형의 변경은 간의 조직병리학적 변화의 개선 및 증가된 생존율로 반영되는 시스템 농도의 정상화일 수 있다.
- [0074] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 CBSDH를 갖는 대상체에서 tHcy 수준을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. tHcy 수준은 야생형 수준의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 15, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 2-5, 2-10, 2-20, 2-30, 2-40, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-30, 3-40, 3-50, 4-6, 4-10, 4-20, 4-30, 4-40, 4-50, 5-7, 5-10, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 6-8, 6-10, 6-20, 6-30, 6-40, 6-50, 7-10, 7-20, 7-30, 7-40, 7-50, 8-10, 8-20, 8-30, 8-40, 8-50, 9-10, 9-20, 9-30, 9-40, 9-50, 10-20, 10-30, 10-40, 10-50, 20-30, 20-40, 20-50, 30-40, 30-50 또는 40-50배로 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, tHcy 수준은 야생형 수준의 약 30배로 감소된다. 비제한적 예로서, tHcy 수준은 야생형 수준의 약 3 내지 5배로 감소된다.
- [0075] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 tHcy 수준을 저하시키고 따라서 높은 tHcy 수준(예를 들면, 야생형 수준의 54배 초과)과 연관된 질환, 장애 및/또는 병태를 치료하거나 이의 효과를 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 높은 tHcy 수준과 연관된 질환, 장애 및/또는 병태의 비제한적 예는 안면 탈모증, 골다공증, 안구 수정체의 이탈 및 평균 생존율의 감소가 포함된다.
- [0076] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 시스템 농도 보충 없이 시스템 수준을 정상화시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0077] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체에서 호모시스테인의 농도를 감소시키기 위해 베타인과 병용될 수 있다. 호모시스테인은 병용 요법을 사용하였을 때 대상체에서 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 67%, 69%, 70%, 74%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 95% 초과로 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인은 77% 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인은 76% 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인은 74% 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인은 40% 감소될 수 있다.
- [0078] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대사산물 수준의 증가 및/또는 감소와 같은 변화를 유발하기 위해 사용될 수 있다.
- [0079] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대사산물 수준의 증가와 같은 변화를 유발하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 대사산물은 시스타티오닌 및 시스템일 수 있으며, 이는 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 67%, 69%, 70%, 74%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 1120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 310%, 320%, 330%, 340%, 350%, 360%, 370%, 380%, 390%, 400%, 410%, 420%, 430%, 440%, 450%, 460%, 470%, 480%, 490%, 500%, 510%, 520%, 530%, 540%, 550%, 560%, 570%, 580%, 590%, 600%, 610%, 620%, 630%, 640%, 650%, 660%, 670%, 680%, 690%, 700%,

710%, 720%, 730%, 740%, 750%, 760%, 770%, 780%, 790%, 800%, 810%, 820%, 830%, 840%, 850%, 860%, 870%, 880%, 890%, 900%, 910%, 920%, 930%, 940%, 950%, 960%, 970%, 980%, 990%, 1000% 또는 1000% 초과로 증가될 수 있다. 비제한적 예로서, 시스타티오닌의 양은 0.008, 0.01, 0.015, 0.020, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055, 0.06, 0.065, 0.07, 0.075, 0.08, 0.085, 0.09, 0.095, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 또는 0.35  $\mu\text{M}$ 을 상회하도록 증가될 수 있거나, 시스타티오닌은 0.05 내지 0.35  $\mu\text{M}$ 가 되도록 증가될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 시스테인의 양은 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400  $\mu\text{M}$ 을 상회하도록 증가될 수 있거나, 시스테인은 200  $\mu\text{M}$  내지 400  $\mu\text{M}$ 가 되도록 증가될 수 있다.

[0080] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대사산물 수준의 감소와 같은 변화를 유발하기 위해 사용될 수 있다. 비제한적 예로서, 대사산물은 호모시스테인, 메티오닌 및 S-아데노실 호모시스테인일 수 있으며, 이는 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 52%, 55%, 60%, 65%, 67%, 69%, 70%, 74%, 75%, 76%, 77%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%만큼 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 호모시스테인의 양은 약 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1  $\mu\text{M}$ 가 되도록 감소될 수 있다. 비제한적 예로서, 메티오닌의 양은 약 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 또는 1  $\mu\text{M}$ 이 되도록 감소될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, S-아데노실 호모시스테인의 양은 약 0.15, 0.14, 0.13, 0.12, 0.11, 0.10, 0.095, 0.09, 0.085, 0.08, 0.075, 0.07, 0.065, 0.06, 0.055, 0.05, 0.045, 0.04, 0.035, 0.03, 0.025, 0.02, 0.015, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002, 0.001 또는 0.001  $\mu\text{M}$  미만이 되도록 감소될 수 있다.

[0081] 한 실시형태에서, 본원에 기재된 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체에서 호모시스테인, 메티오닌, S-아데노실-메티오닌 및 S-아데노실-호모시스테인의 수준을 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0082] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체에서 시스테인 및 시스타티오닌의 수준을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0083] 추가 양상에서, 본 발명은 인간 시스타티오닌 신타제를 재조합적으로 생산하고 정제하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 인간 CBS 효소 또는 이의 절두형 또는 돌연변이형 변이체를 암호화하는 핵산 서열을 발현 벡터로 클로닝하는 단계를 포함한다. 비제한적 예로서, 상기 효소 및 방법은 국제 공개공보 제W02014120770호(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)에 제시된 바와 같고 구체적으로 서열번호 01, 서열번호 02, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16으로서 제시될 수 있다.

#### [0084] 투여 및 투약

[0085] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 비경구 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0086] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 피하(SC), 정맥내(IV) 또는 복강내(IP) 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 피하 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 정맥내 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 복강내 투여에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 삼투 펌프에 의해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0087] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체에게 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 또는 20회 초과로 투여될 수 있다.

[0088] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 투여는 매 1분마다, 2분마다, 3분마다, 4분마다, 5분마다, 6분마다, 7분마다, 8분마다, 9분마다, 10분마다, 15분마다, 20분마다, 25분마다, 30분마다, 35분마다, 40분마다, 45분마다, 50분마다, 55분마다, 1시간마다, 2시간마다, 3시간마다, 4시간마다, 5시간마다, 6시간마다, 7시간마다, 8시간마다, 9시간마다, 10시간마다, 11시간마다, 12시간마다, 13시간마다, 14시간마다, 15시간마다, 16시간마다, 17시간마다, 18시간마다, 19시간마다, 20시간마다, 21시간마다, 22시간마다, 23시간마다, 매일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 매주, 격주, 3주마다, 매월, 2개월, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다, 7개월마다, 8개월마다, 9개월마다, 10개월마다, 11개월마다, 매해마다, 13개월마다, 14개월마다, 15개월마다, 16개월마다, 17개월마다 또는 18개월마다 반복될 수 있다.

[0089] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 투여는 수분, 수시간, 수일 또는 수주 간

격일 수 있는 한 시리즈의 투여량일 수 있다. 한 시리즈에서의 투여량의 수는 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다. 비제한적 예로서, 대상체에게는 24시간 간격으로 3회 투여량이 투여될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 대상체에게는 12시간 간격으로 5회 투여량이 투여될 수 있다.

[0090] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 투여는 투여량의 제1 시리즈와 제2 시리즈 간에 공백을 갖는 한 시리즈의 투여량의 투약 스케줄에 따를 수 있다. 투여량들 간의 공백은 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월 또는 18개월일 수 있다. 한 시리즈에서의 투여량의 수는 2, 3, 4, 5 또는 6일 수 있다. 비제한적 예로서, 대상체에게는 12시간 간격의 5회 투여량의 제1 시리즈가 투여되고 이어서 첫번째 투여량 14일 후에 대상체에게 12시간 간격의 5회 투여량의 제2 시리즈가 투여된다. 다른 비제한적 예로서, 대상체에게는 8주의 기간에 걸쳐서 투여량의 두 시리즈가 투여되고, 여기서 상기 제1 시리즈는 2주 동안 주 2회의 1회 투여량이고 투여량의 제2 시리즈는 6주 동안 주 3회의 투여량이다.

[0091] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체에게 베타인이 투여된 후 적어도 1회 투여될 수 있다. 베타인 투여와 폐길화된 htCBS 투여 간의 시간은 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월 또는 18개월일 수 있다. 비제한적 예로서, 폐길화된 htCBS는 대상체에게 베타인이 투여된지 14일 후에 투여될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 대상체에게 베타인이 투여된 후에 대상체에게 2회 투여량이 투여될 수 있다. 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 베타인이 투여된지 14일 및 15일 후에 투여될 수 있다.

[0092] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 베타인과 병용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 병용물은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 또는 15회를 초과하여 투여될 수 있다.

[0093] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체는 대상체가 처음에 베타인을 투여받은 후 베타인과 병용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 병용 처리와 본래의 베타인 투여 간의 시간은 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월 또는 18개월일 수 있다. 비제한적 예로서, 대상체에게 우선 베타인이 투여된지 14일 후에 병용물이 투여될 수 있다. 다른 비제한적 예로서, 대상체에게 먼저 베타인이 투여된 후에 대상체에게 2회 투여량이 투여될 수 있다. 병용물은 베타인이 투여된지 14일 후 및 15일 후에 투여될 수 있다.

[0094] 한 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이체의 투여량은 5 mg/kg, 5.5 mg/kg, 6 mg/kg, 6.5 mg/kg, 7 mg/kg, 7.5 mg/kg 또는 8 mg/kg과 같은 5 내지 8 mg/kg일 수 있다. 특정 실시형태에서, 투여량은 약 2 mg/kg 내지 약 24 mg/kg의 범위로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 투여량은 약 2 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 10 mg/kg 또는 약 24 mg/kg이다. 특정 실시형태에서, 투여량은 약 0.01 내지 약 10 mg/kg의 범위로부터 선택된다. 예를 들면, 투여량은 약 0.4 mg/kg이다. 특정 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 메티오닌-제한 식이 중인 대상체에게 투여된다. 대안으로, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 메티오닌-제한 식이 중이 아닌 대상체에게 투여된다.

[0095] 한 실시형태에서, 폐길화된 htCBS 또는 폐길화된 htCBS 돌연변이 폴리펩타이드는 또 다른 CBSDH 치료용 치료제와 공동-투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "공동-투여"는 2가지 이상의 성분들의 투여를 의미한다. 이러한 공동-투여를 위한 성분들에는 폐길화된 htCBS, 폐길화된 htCBS 돌연변이체, 베타인 또는 비타민 B6가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 공동-투여는 2가지 이상의 성분들을 동시에 또는 투여 간에 1초, 5초, 10초, 15초, 30초, 45초, 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 16분, 17분, 18분, 19분, 20분, 21분, 22분, 23분, 24분, 25분, 26분, 27분, 28분, 29분, 30분, 31분, 32분, 33분, 34분, 35분, 36분, 37분, 38분, 39분, 40분, 41분, 42분, 43분, 44분, 45분, 46분, 47분, 48분, 49분, 50분, 51분, 52분, 53분, 54분, 55분, 56분, 57분, 58분, 59분, 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간,



3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 1일, 1.5일, 2일 또는 3일 초과와 같은 시간 경과를 두고 투여하는 것을 말한다.

# **정의**

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형("a" "an" 및 the)은 달리 문맥으로부터 명백하지 않다면 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "중합체"란 지칭은 단일 중합체뿐만 아니라 2가지 이상의 동일하거나 상이한 중합체를 포함하고, "부형제"란 지칭은 단일 부형제뿐만 아니라 2가지 이상의 동일하거나 상이한 부형제 등을 포함한다.

값들의 범위가 제공될 경우, 그 범위의 상한치와 하한치 사이의 각각의 개재 값 및 다른 언급된 값 또는 언급된 범위 내의 개재 값은 본 명세서 내에 포함되고 구체적으로 개시하고자 의도된다. 예를 들면, 1  $\mu\text{m}$  내지 8  $\mu\text{m}$ 의 범위가 언급될 경우, 2  $\mu\text{m}$ , 3  $\mu\text{m}$ , 4  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 6  $\mu\text{m}$  및 7  $\mu\text{m}$ 뿐만 아니라 1  $\mu\text{m}$  이상의 값들의 범위 및 8  $\mu\text{m}$  이하의 값들의 범위를 명백하게 개시하고자 의도된다.

"암호화 서열"은 (i) 단백질의 아미노산 서열로 번역되는 mRNA; 또는 (ii) 간접 RNA 또는 안티센스 분자와 같은 기능적 RNA를 암호화하는 핵산의 부분(예를 들면, 유전자)을 지칭한다.

"재조합"은, 예를 들면, 세포, 핵산, 폴리펩타이드, 발현 카세트 또는 벡터와 관련하여 사용될 경우, 물질 또는 이 물질의 천연 또는 본래 형태에 상응하는 물질이 새로운 모이어티의 도입 또는 기존의 모이어티의 변경에 의해 변형되었거나 이와 동일하지만 합성 물질로부터 생산되거나 유래됨을 말한다. 예를 들면, 재조합 세포는 세포의 본래(비-재조합) 형태 내에서 발견되지 않는 유전자(즉, "외인성 핵산")를 발현하거나, 달리 상이한 수준에서 발현되는, 전형적으로는 하향-발현되거나 전혀 발현되지 않는 본래의 유전자를 발현한다.

재조합 기술은, 예를 들면, 발현 벡터와 같은 발현 시스템 내로의 삽입을 위해 단백질을 암호화하는 cDNA 또는 안티센스 서열과 같은 재조합 핵산의 사용을 포함할 수 있으며; 생성된 작제물은 세포내로 도입되며, 이 세포는 핵산 및 적절한 경우 단백질을 발현한다. 재조합 기술은 또한 핵산을 상이한 공급원으로부터의 암호화 또는 프로모터 서열에 연결시켜 융합 단백질의 발현, 단백질의 구성적 발현 또는 단백질의 유도성 발현을 위한 하나의 발현 카세트 또는 벡터 내로 도입하는 것을 포함한다.

용어 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 포유동물은 인간을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

"연관된"은 질환, 병태 또는 표현형의 발달 또는 표출과의 우연의 일치를 말한다. 연관된 변경되면 각종 질환 및 병태의 토대를 제공할 수 있는 하우스키핑(housekeeping) 기능을 책임지는 유전자, 특정한 질환, 병태 또는 표현형에 관여하는 경로의 부분인 유전자 및 질환, 병태 또는 표현형의 표출에 간접적으로 기여하는 유전자 때문일 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

"생리학적 조건" 또는 "생리학적 용액"은 이온 강도, pH 및 온도가 온전한 포유동물 세포 또는 살아있는 포유동물의 조직 공간 또는 기관 내의 조건과 실질적으로 유사한 수성 환경을 말한다. 전형적으로, 생리학적 조건은 약 150 mM NaCl, pH 6.5 내지 7.6 및 약 22 내지 37°C의 온도를 갖는 수용액을 포함한다. 일반적으로, 생리학적 조건은 생물학적 거대분자의 분자내 연합에 적합한 결합 조건이다. 예를 들면, 150 mM NaCl, pH 7.4, 37°C에서의 생리학적 조건이 일반적으로 적합하다.

"약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체"는 본 발명의 조성물에 임의로 포함될 수 있고 환자에게 유의적인 유해 독성 효과를 유발하지 않는 부형제를 말한다. 특히, 본 경우에 이러한 부형제는 포유동물 대상체에 대한 유의적인 유해 독성 효과 없이 활성 화합물(본원에서는 폐길화된 htCBS)과 연합하여 포유동물 대상체의 신체로 흡수될 수 있는 부형제를 말한다.

본원에서 사용되는 용어 "부형제" 또는 "비히클"은 치료제의 전달을 위한 운반체로서 이용되고 대상체, 예를 들면, 포유동물로의 투여에 적합하거나 약제학적 조성물의 취급 또는 저장 특성을 개선시키기 위해 또는 경구 투여에 적합한 캡슐 또는 정제와 같은 별개의 물품으로의 약제학적 조성물의 투여량 단위의 형성을 허용 또는 촉진하기 위해 약제학적 조성물에 첨가되는, 그 자체로는 치료제가 아닌 임의의 물질을 의미한다. 부형제 및 비히클은 비독성이고 조성물의 다른 성분들과 해로운 방식으로 상호작용하지 않는, 당업계에 공지된 임의의 물질, 예를 들면, 임의의 액체, 겔, 용매, 액체 희석제, 가용화제 등을 포함한다. 투여는 경구 투여, 흡입, 장관 투여, 정맥내 주사에 의한 공급 또는 점종을 의미할 수 있다. 부형제는 표준 약제학적 부형제를 포함할 수



있고, 또한 인간 및/또는 동물 소비를 위한 식품 및 음료, 사료 또는 미끼(bait) 제형 또는 기타 식품류를 제조하기 위해 사용될 수 있는 임의의 성분을 또한 포함할 수 있다.

- [0107] "침투제," "약물," 또는 "약리학적 활성 제제" 또는 임의의 기타 유사한 용어는 목적하는 생물학적 또는 약리학적 효과를 유도하는, 당업계에 이미 공지된 방법에 의한 및/또는 본 명세서에 교시된 방법에 의한 투여에 적합한 펩타이드를 포함한 임의의 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물을 의미하며, 상기 생물학적 또는 약리학적 효과는 (1) 유기체에 예방 효과를 갖고 감염을 예방하는 것과 같이 바람직하지 않은 생물학적 효과를 예방하고/하거나 (2) 질환에 의해 유발된 병태를 완화, 예를 들면, 질환의 결과로서 유발된 통증 또는 염증을 완화시키고/시키거나 (3) 질환을 완화시키거나 감소시키거나 유기체로부터 질환을 완전히 제거하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않을 수 있다. 효과는 국소 마취 효과를 제공하는 것과 같은 국소적일 수 있거나 전신적일 수 있다. 본 명세서는 신규한 침투제 또는 신규한 부류의 활성제에 관한 것이 아니다. 오히려, 본 발명은 당업계의 기술 수준에 존재하거나 이후에 활성제로서 확립될 수 있고 본 발명에 의한 전달에 적합한 제제 또는 침투제의 전달 방식으로 한정된다.
- [0108] 용어 "약"은 특히 소정의 양과 관련하여 +/- 5%의 편차를 포함하는 것을 의미한다.
- [0109] "임의의" 또는 "임의로"는 나중에 기재된 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있다는 것을 의미하며, 따라서 상기 기재는 상기 상황이 존재하거나 발생하는 경우 및 상황이 존재하지 않거나 발생하지 않는 경우를 포함한다.
- [0110] 특정 특징 또는 실체의 "실질적으로 부재인" 또는 "실질적으로 없는"은 특징 또는 실체가 거의 전적으로 또는 완전히 부재임을 의미한다. 예를 들면, 폐결화된 htCBS가 투여되는 대상체에 있어서, 관찰가능한 부작용의 실질적 부재는 이러한 부작용이 검출 불가능하거나 오직 무시해도 될 정도, 예를 들면, 치료되지 않은 환자에서 관찰된 동일한 부작용의 빈도 또는 강도와 비교할 때 약 50% 이상 감소된 정도 또는 빈도로만 발생함을 의미한다.
- [0111] 용어 "약리학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"은, 본 조성물과 관계될 때, 비독성이지만 치료될 대상체의 혈류 중에서 또는 작용 부위(세포내)에 목적하는 수준을 제공하고/하거나 호모시스틴뇨증의 표출의 개선과 같은 목적하는 생리학적, 생물물리학적, 생화학적, 약리학적 또는 치료학적 반응을 제공하기에 충분한 활성제(또는 활성제를 함유하는 조성물)의 양을 말한다. 필요한 정확한 양은 대상체마다 달라질 것이며 활성제, 조성물의 활성, 이용되는 전달 장치, 조성물의 물리적 특징, 의도된 환자 사용법(즉, 1일당 투여되는 투여량의 수)과 같은 수많은 인자들뿐만 아니라, 대상체의 종, 연령 및 전반적 상태, 치료될 병태의 중증도, 환자가 복용하는 추가 약물, 투여 방식 등과 같은 환자 고려사항에 의존할 것이다. 이러한 인자들 및 고려사항들은 본원에 제공된 정보에 기초하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 임의의 개체에서 적절한 "유효량"은 본원에 제공된 정보에 기초하여 통상의 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0112] 용어 "생물학적 활성"은 당업자에 의해 핵산 또는 단백질에 전형적으로 기인하는 임의의 생물학적 활성을 말한다. 생물학적 활성의 예는 효소 활성, 다른 단백질 또는 핵산 분자를 이량체화하거나 폴딩하거나 이에 결합하는 능력 등이다.
- [0113] 용어 "핵산"은 RNA의 형태 또는 DNA의 형태일 수 있으며 메신저 RNA, 합성 RNA 및 DNA, cDNA 및 게놈 DNA를 포함한다. DNA는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 단일 가닥일 경우 암호화 가닥 또는 비-암호화(안티-센스, 상보적) 가닥일 수 있다.
- [0114] 본원에서 사용되는 바와 같이, "변이체"는 진뱅크와 같은 공개 서열 데이터베이스의 서열로 예시되는 바와 같은 야생형 핵산 또는 아미노산 서열의 전체 길이에 걸쳐서 동일하지 않지만 유의적인 상동성(예를 들면, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성)을 갖는 핵산, 단백질 또는 폴리펩타이드이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 디펩타이드, 트리펩타이드 및 테트라펩타이드도 또한 본 발명에 의해 고려되고 포함되지만, "단백질, 폴리펩타이드 또는 이의 펩타이드 단편"은 전체길이 단백질 또는 길이가 통상적으로 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산인 아미노산 서열을 갖는 이의 일부분을 의미한다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, "돌연변이체"는 글리코실화, 단백질 안정화 및/또는 리간드 결합과 관련된 특성 또는 기능을 변경하도록 디자인되거나 조작된 돌연변이된 단백질이다.
- [0116] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "본래의" 또는 "야생형"은 소정의 세포, 폴리펩타이드, 핵산, 형질 또는 표현형과 관련하여, 자연에서 전형적으로 발견되는 형태를 말한다.

- [0117] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질," "폴리펩타이드" "올리고펩타이드" 및 "펩타이드"는 이들의 통상적 의미를 가지며, 길이 또는 번역후 변형(예를 들면, 글리코실화, 인산화, 지질화, 미리스틸화, 유비퀴틴화 등)과 관계없이 아마이드 결합에 의해 공유 결합된 적어도 2개의 아미노산의 중합체를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다. 게다가, 본원에 기재된 폴리펩타이드는 특정한 길이로 한정되지 않는다. 상기 정의에는 D-아미노산 및 L-아미노산, 및 D-아미노산과 L-아미노산의 혼합물이 포함된다. 상기 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예를 들면, 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등 뿐만 아니라 천연 발생 및 비천연 발생 둘 다의 당업계에 공지된 기타 변형을 지칭하지 않거나 이를 배제한다. 폴리펩타이드는 전체 단백질 또는 이의 부분서열(subsequence)일 수 있다. 폴리펩타이드는 또한 에피토프, 즉 실질적으로 폴리펩타이드의 면역원성 특성을 책임지며 면역반응을 일으킬 수 있는 항원 결정기를 포함하는 아미노산 부분서열을 지칭할 수 있다.
- [0118] "에 상응하는 위치"는 다른 참조 핵산 분자 또는 단백질 내의 위치에 상대적인 핵산 분자 또는 단백질 내의 관심대상의 위치(즉, 염기 번호 또는 잔기 번호)를 말한다. 상응하는 위치는 매치되는 뉴클레오타이드 또는 잔기의 수가 최대화되도록, 예를 들면, 서열들 간의 동일성이 90% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과가 되도록 서열을 정렬하고 비교함으로써 결정할 수 있다. 이어서, 관심대상의 위치에 참조 핵산 분자에서 할당된 번호가 주어진다. 예를 들면, 유전자-X에서의 특정 다형성(polymorphism)이 서열번호 X의 2073번 뉴클레오타이드에서 발생할 경우, 다른 대립형질 또는 분리체에서 상응하는 뉴클레오타이드를 동정하기 위해 서열을 정렬한 다음, 2073과 일렬로 배열되는 위치를 동정한다. 다양한 대립유전자는 길이가 상이할 수 있기 때문에, 2073을 지정하는 위치는 2073번 뉴클레오타이드가 아닐 수 있지만, 대신 참조 서열 내의 위치에 "상응하는" 위치이다.
- [0119] "서열 동일성의 백분율" 및 "상동성 백분율"은 폴리뉴클레오타이드들 및 폴리펩타이드들 간의 비교를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되고 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적 배열된 서열을 비교함으로써 결정되고, 여기서 비교 윈도우의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 일부는 2개의 서열의 최적 배열을 위해(부가 또는 결실을 함유하지 않는) 참조 서열과 비교하여 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은, 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에서 발생하는 위치의 수를 측정하여 매치되는 위치의 수를 산출하고, 매치되는 위치의 수를 비교 윈도우 내의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산할 수 있다. 대안으로, 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에서 발생하거나 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 갭과 정렬되는 위치의 수를 측정하여 매치되는 위치의 수를 산출하고, 매치되는 위치의 수를 비교 윈도우 내의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산할 수 있다. 당업자는 두 서열을 정렬하는데 이용될 수 있는 많은 확립된 알고리즘이 존재함을 인식하고 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들면, Smith & Waterman의 국소 상동성 알고리즘(참조: *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)), Needleman & Wunsch의 상동성 정렬 알고리즘(참조: *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)), Pearson & Lipman의 유사성 방법을 위한 탐색(참조: *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)), 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 실행(GCG 위스콘신 소프트웨어 패키지의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA) 또는 육안 검사(일반적으로 문헌[참조: *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)]을 참조)에 의해 수행할 수 있다. 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트를 측정하기에 적합한 알고리즘의 예는 각각 문헌[참조: Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410] 및 문헌[참조: Altschul *et al.* (1977) *Nucleic Acids Res.* 3389-3402]에 기재된 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립 생물정보센터(National Center for Biotechnology Information) 웹사이트를 통해 공개적으로 입수가 가능하다. 이러한 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열 내 동일한 길이의 워드와 정렬했을 때 역치 점수 T에 매치되거나 이를 충족시키는 질의 서열 내의 길이 W의 짧은 워드를 동정함으로써 높은 점수의 서열 쌍(HSP)을 확인하는 것을 수반한다. T는 이웃 워드 점수 역치를 말한다(참조: Altschul *et al.*, 상기 문헌). 이들 초기 이웃 워드 히트는 이것을 함유하는 보다 긴 HSP를 찾아내는 검색을 개시하기 위한 "시드"로서 작용한다. 이어서, 워드 히트는 누적 정렬 점수가 증가될 수 있는 한, 각각의 서열을 따라 양쪽 방향으로 연장된다. 누적 점수는 뉴클레오타이드 서열에 대해 파라미터 M(매치 잔기의 쌍에 대한 보상 점수; 항상 > 0) 및 N (미스매치 잔기에 대한 패널티 점수; 항상 < 0)을 사용하여 계산한다. 아미노산 서열의 경우에는 점수화 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. 누적 정렬 점수가 이의 최대 달성 값으로부터 X의 양만큼 하락하거나; 하나 이상의 음으로 점수화된 잔기 정렬의 축적으로 인해 누적 점수가 0 이하로 떨어지거나; 또는 어느 한쪽의 서열의 말단에 도달한 경우에, 각 방향으로의 워드 히트의 연장이 중단된다. BLAST 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 감도 및 속도를 결정한다. BLASTN 프로그램(뉴클레오타이드 서열의 경우)은 디폴트로서 워드 길이(W) 11, 기대값(E) 10, M=5, N=-4 및 양쪽 가닥의 비교를 사

용한다. 아미노산 서열의 경우, BLASTP 프로그램은 디폴트로서 워드 길이 3, 예상값(E) 10 및 BLOSUM62 점수화 매트릭스를 사용한다(문헌[참조: Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)]을 참조).

[0120] 모든 상기 언급된 알고리즘 및 프로그램이 서열 정렬 및 % 서열 동일성의 측정에 적합하지만, 본 발명의 목적상 % 서열 동일성의 측정은 전형적으로 제공된 디폴트 파라미터를 사용하는 GCG 위스콘신 소프트웨어 패키지 (Accelrys, 위스콘신주 매디슨)의 BESTFIT 또는 GAP 프로그램을 사용하여 수행할 것이다.

[0121] 용어 "NH<sub>2</sub> 말단 변형"은 본원에 기재된 펩타이드를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 아미노 말단에 상응하는 본 발명의 펩타이드 화합물의 말단은, 존재할 경우, "유리" 형태(예를 들면, H<sub>2</sub>N-)로 존재할 수 있거나 또는 화학식 R<sup>2</sup>C(O)- 또는 R<sup>2</sup>S(O)<sub>2</sub>- (여기서, R<sup>2</sup>는 이전에 정의된 바와 같다)의 그룹으로 아실화될 수 있다. 한 실시형태에서, R<sup>2</sup>는 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 알킬, (C<sub>5</sub>-C<sub>10</sub>) 아릴, (C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>) 아릴알킬, 5원 내지 10원 헤테로아릴 또는 6원 내지 16원 헤테로아릴알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0122] 다른 실시형태에서, 아미노 말단은 화합물에 낮은 항원성과 같은 특정된 특성을 부여하도록 디자인된 차단 그룹으로 "차단"될 수 있다. 이러한 차단 그룹의 비제한적 예에는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 폴리알킬렌 옥사이드 중합체가 포함된다. 화합물 및 특히 펩타이드 및 단백질에 특정된 특성을 부여하는데 유용한 다양한 중합체는 당업계에 공지되어 있으며, 이는 이러한 중합체를 화합물에 부착시키기에 적합한 화학도 마찬가지이다. 구체적인 비제한적 예는 미국 특허 제5,643,575호; 제5,730,990호; 제5,902,588호; 제5,919,455호; 제6,113,906호; 제6,153,655호; 및 제6,177,087호에서 찾아볼 수 있으며, 이의 개시내용은 본원에서 참조로 포함된다.

[0123] 용어 "카복시 말단 변형"은 본원에 기재된 펩타이드와 관련하여 사용될 수 있다. C-말단에 상응하는 펩타이드 화합물의 말단은, 존재할 경우, 유리 산으로서 또는 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 염 또는 무기 또는 유기 이온의 기타 염과 같은 염으로서 유도체화되지 않은 카복실 그룹의 형태로 존재할 수 있거나, 에스테르, 티오에스테르 또는 아마이드와 같은 유도체화된 카복실의 형태로 존재할 수 있다. 이러한 유도체화된 형태의 화합물은 카복실 말단을 갖는 화합물을 적절한 알코올, 티올 또는 아민과 반응시켜 제조할 수 있다. 적합한 알코올, 티올 또는 아민은, 예시로서 제한 없이, 화학식 R<sup>2</sup>OH의 알코올, 화학식 R<sup>2</sup>SH의 티올 및 화학식 R<sup>2</sup>NH<sub>2</sub>, R<sup>2</sup>R'NH 또는 NH<sub>3</sub>의 아민을 포함하며, 여기서 각각의 R<sup>2</sup>는 서로 독립적으로 이전에 정의된 바와 같다.

[0124] 용어 "L 또는 D 형태 아미노산"은 본원에 기재된 펩타이드와 관련하여 사용될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물을 구성하는 다양한 X<sup>n</sup> 잔기들은 이들의 C<sub>α</sub> 탄소에 관해 L-입체배치 또는 D-입체배치에 있을 수 있다. 한 실시형태에서, 특정 화합물의 모든 C<sub>α</sub> 탄소는 동일한 입체배치에 있다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 화합물은 하나 이상의 C<sub>α</sub> 탄소(들)에 관해 특정한 키랄성을 포함하고/하거나 화합물에 특정된 특성을 부여하도록 특정된 위치에 비-펩타이드 연결을 포함한다. 예를 들면, D-아미노산의 전체 또는 일부분에 포함된 펩타이드가 이의 상응하는 L-펩타이드 대응물보다 프로테아제에 대해 더 내성이다. 따라서, 한 실시형태에서, 화합물은 D-아미노산의 전체 또는 일부분에 포함된 펩타이드이다. 대안으로, 프로테아제에 대한 우수한 안정성을 갖는 화합물은 특정된 위치에 반전된 극성의 펩타이드 연결을 포함하는 펩타이드 유사체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 트립신-유사 프로테아제에 대한 안정성을 갖는 화합물은 각각의 L-Arg 또는 L-Lys 잔기 전에 반전된 극성의 펩타이드 연결을 갖는 펩타이드 유사체를 포함한다; 키모트립신-유사 프로테아제에 대한 안정성을 갖는 화합물은 각각의 소형 및 중형 L-지방족 잔기 또는 L-비극성 잔기 전에 반전된 극성의 펩타이드 연결을 갖는 펩타이드 유사체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 프로테아제에 대한 안정성을 갖는 화합물은 전적으로 반전된 극성의 펩타이드 결합으로만 이루어진 펩타이드 유사체를 포함한다. 프로테아제에 대한 안정성을 갖는 기타 실시형태는 당업자에게 자명할 것이다. 화합물의 추가의 구체적인 실시형태는 본원에 기재되어 있다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "장기간 투여"는 PEG 모이어티에 접합된 CBS 효소인 htCBS 또는 htCBS 돌연변이체(예를 들면, C15S 돌연변이를 갖는)의 6주 이상의 기간에 걸친 투여를 말한다.

[0126] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "연속적 투여"는 PEG 모이어티에 접합된 CBS 효소인 htCBS 또는 htCBS 돌연변이체(예를 들면, C15S 돌연변이를 갖는)의 SC 주사 또는 이식된 삼투 펌프를 통한 연구 과정 전반에 걸친 반복된 투여를 말한다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "I278T", "I278T 동형접합" 또는 "I278T +/- 동형접합" 마우스는 내인성 마

우스 *cbs* 유전자가 녹아웃되었고 호모시스틴뇨증과 연관된 CBS 대립유전자에서 가장 흔한 돌연변이, 833T>C(I278T)를 갖는 인간 CBS 전이유전자가 마우스 게놈에 통합된 플라스미드상에 아연-유도성 프로모터의 제어하에 cDNA 클론으로서 삽입된 마우스 모델을 말한다.

## [0128] 실시예

[0129] 하기 실시예는 사실상 예시적이며 결코 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

## [0130] 실시예 1. 실험 과정

### [0131] A. *PET29A(+)* 벡터 내의 서열-최적화된 절두형 인간 CBS의 작제

[0132] 국제 공개공보 제W02014120770호(이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다)에 이미 기재된 바와 같이, 전체길이(551 aa) 인간 CBS 암호화 서열은 GenScript USA Inc(미국 뉴저지주)에 의해 세균 발현에 최적화되고 EcoRV 제한 효소로 분해된 후 pUC57 벡터 내로 클로닝되었다. 이어서, CBS 서열을 프라이머 A1 및 A2를 이용하여 PCR에 의해 증폭시켜 절두형 효소(aa 1-413)를 암호화하는 서열을 생성시켰다. 이어서, PCR 생성물을 제한 효소 NcoI 및 XhoI를 이용하여 분해시키고, 동일한 효소들을 이용하여 분해시킨 pET-28a(+) 벡터로 연결시켰다. pET-28a(+)의 최적의 NcoI 부위 내로의 클로닝은 CBS 야생형 서열과 비교하여 G에서 C로의 돌연변이를 생성시켰다. 프라이머 B1 및 B2를 이용한 부위 특이적 돌연변이유발 키트(Stratagene, 미국 캘리포니아주)를 이용하여 야생형 서열(htCBS)을 재생시켰다. 동일한 전략을 사용하여, 프라이머 C1 및 C2를 이용함으로써 C15S 돌연변이체(T에서 A로의 돌연변이; htCBSC15)를 생성시켰다. 모든 서열들은 서열 분석(sequencing)에 의해 검증하였다. 절두형 CBS의 서열의 발현은 pET-28a(+) 벡터 내에서 상류 T7 프로모터에 의해 제어되며, 이는 DE3 세균으로의 형질전환 및 IPTG에 의한 유도를 필요로 한다. 표 1은 프라이머들 및 이들의 서열 식별자를 기재한 것이다.

표 1

### 프라이머

프라이머 명칭	서열번호
A1	7
A2	8
B1	9
B2	10
C1	11
C2	12
pKK-F ( <i>SphI</i> )	5
pKK-R ( <i>Kpn I</i> )	6

### [0134] B. 발현 및 정제

[0135] 절두형 인간 CBS를 암호화하는 서열을 보유한 pET-28a(+) 벡터를 DE3 세균, 즉 이. 콜라이 BL-21(DE3) 또는 HMS174(DE3)으로 형질전환시키고 카나마이신-내성 클론으로부터의 세균을 275 RPM의 회전 진탕기상에서 30  $\mu$ g/ml 카나마이신을 함유한 5 ml의 루리아-베르타니(Luria-Bertani; LB) 배지에서 37℃에서 밤새 성장시켰다. 1 ml의 하룻밤 배양물을 30  $\mu$ g/ml 카나마이신을 함유한 100 ml 테리픽 브로쓰(Terrific Broth; TB) 배지에 첨가하고 밤새 성장시켰다. 이어서, 10 ml를 0.001%의 티아민-HCl pH 8.0, 0.0025%의 피리독신-HCl pH 8.0, 0.3 mM  $\delta$ -ALA pH 8.0, 150  $\mu$ M 염화제2철, 30  $\mu$ g/ml의 카나마이신을 함유한 1리터 TB 배지에 첨가하였다. 이어서, OD<sub>600</sub>이 약 0.6 내지 0.7의 값에 도달할 때까지 배양물을 회전 진탕기상에서 30℃에서 275 RPM으로 성장시키고, 1 mM IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 발효를 추가 16시간 동안 지속시켰다. 세포를 10분 동안 4℃에서 6000 RCF로 원심분리하여 수거하고 빙냉 0.9% NaCl로 세척하고 상기와 같이 재원심분리하고 -80℃에서 동결시켰다. 그 다음, 펠렛 1그램당 4.45 ml의 용해 완충액(20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.2, 40 mM NaCl, 0.1 mM PLP)을 세포 펠렛에 첨가하고, 이 펠렛을 Dounce 균질기에서 균질화시키고 리소자임(2 mg/ml 최종)으로 처리하고 락킹 플랫폼(rocking platform)상에서 4℃에서 1시간 동안 항온배양하고 초음파 처리하여 점도를 감소시키고, 53000 RCF로 원심분리하였다. 이어서, 가용성 분획을 포함하는 상청액을 -80℃에서 저장하였다. 용해물을 다단계 크로마토그래피 과정을 통해서 가공하였다. 핵심 공정은 음이온 교환 포획 컬럼(DEAE Sepharose-FF)에 이은 친화성 컬럼으로 이루어진다. 이는 약 90%의 순도를 달성한다. 1회 또는 2회의 연마 크로마토그래피 단계의 사용에 의



해 99% 초과와 최종 순도가 성취된다. 최종 컬럼 용출액을 PBS로 정용여과하였다.

[0136] C. 효소 활성 검증

[0137] CBS 활성을  $C^{14}$ -표지된 세린을 기질로서 사용하여 방사성동위원소 검정에 의해 측정하였다. 희석 완충액(0.1 M Tris-HCl pH=8.6, 1 mM DTT, 10  $\mu$ M PLP, 0.5 mg/ml BSA) 중의 10 $\mu$ l(총 490 ng)의 순수한 htCBS 또는 10  $\mu$ l의 혈장을 0.1 M Tris-HCl pH=8.6, 10 mM L-세린, 0.5 mM PLP, 0.5 mg/ml BSA 및 0.3  $\mu$ Ci(순수한 효소의 경우) 또는 0.45  $\mu$ Ci(혈장의 경우)의 L- $[C^{14}(U)]$ -세린을 함유하는 85  $\mu$ l의 반응 혼합물에 첨가하였다. 샘플을 37℃에서 5분 동안 항온배양하고, 5 $\mu$ l의 0.2 M Hcy(10 mM 최종 농도)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 37℃에서 30분 동안 항온배양한 후, 검정 혼합물의 20 $\mu$ l 분취액을 등급 3 CHR 와트만지(미국 뉴저지주)에 적용하였다. 각 반응 시간이 30분이 되도록 시차를 두고 검정 개시 및 생성된 혼합물의 샘플링을 수행하였다. 하강여지 크로마토그래피를 사용하여 표지된 기질(Ser)로부터 방사성 생성물(Cth)을 분리시켰다. 반응에서 형성된  $C^{14}$ -시스타티오닌을 2-프로판올/포름산/H<sub>2</sub>O(75: 5.7: 18.9 v/v) 중에서 밤새 하강여지 크로마토그래피하여  $C^{14}$ -세린으로부터 분리시켰다. 크로마토그램을 스트립으로 절단하고 이를 5 ml의 옵티-플루오르(Opti-fluor) 신틸레이션 각테일(PerkinElmer, 미국 매사추세츠주)에 침지시키고 Beckman LS-3801 신틸레이션 계수기에서 계수하여 마커 시스타티오닌(마커 레인을 니히드린으로 염색시켜 검출됨) 영역의 방사성을 측정하였다. 효소-비함유 샘플을 배경 방사성을 모니터링하기 위한 블랭크(blank)로서 사용하였고, 이어서 상기 배경 방사성을 샘플에서 공제하였다. 순수한 효소의 경우, 비활성값은 CBS mg당 효소 단위(1  $\mu$ mol의 시스타티오닌/시간을 생산하는 효소의 양)로서 표현하고, 혈액 샘플의 경우 혈장  $\mu$ l당 단위로서 표현한다. 약동학적(PK) 연구에서, 비활성은 다음과 같이 지정되었다: mU/혈장  $\mu$ l.

[0138] D. 겔내 활성 검증

[0139] 단백질 샘플을 네이티브(Native) Page(Bio-Rad, 미국 캘리포니아주)를 사용하여 분리시켰다. 이어서, 겔을 염색 용액(100 mM Tris-HCl pH=8, 20 mM L-시스테인, 50 mM 2-머캅토에탄올, 0.1 mM PLP 및 0.2 질산납) 중에서 15 내지 30분 동안 항온배양하였다. 겔을 7% 아세트산에 침지시켜 반응을 중단시켰다.

[0140] E. 대사산물 농도의 측정

[0141] 혈장 대사산물 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인을 문헌[참조: Allen et al., 1993, Metabolism, 42: 1448-1460]에서 이미 설명된 안정한-동위원소-희석 액체 크로마토그래피 질량 분광법에 의해 측정하였다. 조직 내의 총 단백질 비-결합된 호모시스테인 및 기타 아미노산을 뿐만 아니라 아미노산의 측정을 문헌[참조: Maclean et al., 2010b, Mol. Genet. Metab. 101, 153-162]에 설명된 바와 같이 수행하였다. 대사산물을 안정한-동위원소-희석 액체 크로마토그래피 질량 분광법에 의해 측정하였다.

[0142] F. 폐길화

[0143] 폴리에틸렌 글리콜 분자는 NOF 코포레이션(일본 도쿄)로부터 구입하였다. 제조업자의 설명서에 따라서 폐길화를 수행하였다. 예를 들면, PEG 말레이미드 유도체의 htCBS (5 mg/ml)의 SH 그룹으로의 커플링을 100 mM 포스페이트 완충액 pH=6.5 중에서 4℃에서 밤새 수행하였다. PEG 분자 대 CBS 단백질의 몰비는 10:1 또는 5:1이었다.

[0144] 대안으로, 폐길화는 20kDa NHS-에스테르 PEG(ME-200GS)를 htCBS C15S(C15S 돌연변이를 갖는 절두형 인간 CBS)와 접합시켜 달성하였다. 하기 프로토콜은 폐길화 과정을 요약한 것이다.

[0145] 크로마토그래피에 의해 정제된 htCBS C15S를 완충액 교환하고 100mM 인산나트륨 완충액 pH 7.2 중에서 제형화하고 적어도 10 mg/ml까지 농축시켰다. 효소 분취액을 -80℃에서 저장하고 가끔 혼합하면서 37/42℃ 수조에서 해동시켰다. 효소 분취액을 스피닝 다운(spining down)하여, 만약 있다면, 생성된 발포체를 제거하고, 필요할 때까지 빙상에서 보관하였다.

[0146] 폐길화 몰비는 1:10(htCBS C15S 서브유닛당)이었고, 이는 htCBS C15S 100 mg당 ME-200GS 431 mg으로 해석된다. 계산된 양의 단백질, 물 및 2x 완충액(오직 효소의 농도가 10 mg/ml보다 높을 경우에만 필요함)을 멸균 내독소-비함유 50 ml 팔콘 튜브에서 혼합하였다. 예를 들면, 20 mg/ml의 htCBS C15S 200 mg의 폐길화는 10 ml의 단백질, 12 ml의 멸균수 및 10 ml의 100mM Na-P pH7.2 완충액을 필요로 하였다. 튜브는 32 ml의 총 용적을 함유하였고 이를 빙상에서 보관하였다. 별도의 튜브에서, 862 mg의 ME-200GS PEG를 혼합, 와동(vortexing) 또는 짧은 시간 동안 37/42℃ 수조 내에서의 임의적 가운에 의해 DMSO 또는 멸균수에 용해시켰다. PEG를 투명한 고 점성

용액에 신속히 용해시켰다. 희석된 효소를 붓거나 피펫팅하여 용해된 PEG를 함유하는 튜브로 즉시 옮겼다. 상기 튜브를 단단히 밀폐시키고 즉시 10 내지 15초 동안 와동시켜 균질한 혼합물을 생성시켰다. 튜브를 락킹 플랫폼 상에서 RT에서 4 내지 6시간 동안 항온배양하거나 4℃에서 밤새 항온배양하였다.

[0147] G. 효소 보관

[0148] 폐길화된 htCBS C15S를 PBS pH7.4를 사용하여 제형화하고 대략 적어도 5 mg/ml 및 전형적으로 10 내지 25 mg/ml의 농도로 농축시켰다. 효소를 -80℃에서 (1.2 ml) 분취액으로서 저장하였다. 각 투약일마다 PBS에 1 mg/ml의 최종 농도로 희석시켜 1회용의 신선한 효소 용액을 제조하였다. 투약 완료시 남아있는 모든 용액은 폐기하였다.

[0149] H. 동물 절차

[0150] 모든 동물 절차는 AAALAC 승인(#00235), 공공보건국 보장(Public Health Service Assured)(#A 3269-01) 및 USDA 허가(Licensed)(#84-R-0059) 기관인 콜로라도 대학교 덴버 캠퍼스 IACUC에 의해 승인되었다. C57BL/6J 및 CBS 녹아웃(KO) 마우스는 잭슨 래보러토리(Jackson Laboratory)(미국 메인주)로부터 입수하였다. 인간 단독(HO) 마우스는 이미 실험실에서 생성시켰다(참조: Maclean *et al.*, 2010b. *Mol. Genet. Metab.* 101, 153-162). 동물들은 사료와 물에 무제한 접근할 수 있게 하면서 압출 표준식이 2918(Harlan, 미국 캘리포니아주)로 유지시켰다.

[0151] 대표 새끼 마우스를 동형접합성에 대해 통상적으로 분석하였다. 하악하 출혈용 1회용 란셋을 겔을 함유한 Capiject T-MLHG 리튬 헤파린(12.5 IU) 튜브(Terumo Medical Corporation, 미국 뉴저지주) 내로 채혈하여 넣기 위해 사용하였다. 이어서, 튜브를 1200G에서 10분 동안 원심분리한 다음, 혈장을 1.5 ml 튜브로 수집하고 -80℃에서 저장하였다.

[0152] 유전자형 분석: 대표 새끼 마우스를 동형접합성 qPCR에 대해 통상적으로 분석하였다. DNeasy 혈액 및 조직 키트(Qiagen, 독일 힐덴)에 의해 꼬리 생검을 생성시켰다. DNA 품질을 NanoDrop 1000(Thermo Scientific, 미국 델라웨어주)에 의해 모니터링하였다. 20 ng의 DNA 샘플에서 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystem's)(미국 캘리포니아주) Gene Expression 마스터 믹스(품목 #4369016)를 사용하여 싱글-플렉스(single-plex)를 삼중으로 수행하였다. 표준 곡선 방법을 사용하여 어플라이드 바이오시스템즈 7500 Fast Instrument에서 증폭을 수행하였다. 어플라이드 바이오시스템즈 Tert(품목 #4458366) 또는 Tfrc(품목 #4458368) 카피수 참조 검정을 동형접합 단일 카피 교정기로서 사용하였다. 어플라이드 바이오시스템즈 검정 Mr00299300을 사용하여 Neo 유전자를 검출하였다.

[0153] 야생형 스프라그 다울리(Sprague Dawley)는 사료와 물에 무제한 접근할 수 있게 하면서 케이지에서 사육하고 표준 조건하에 유지시켰다.

[0154] 야생형 시노물구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스)는 사료와 물에 무제한 접근할 수 있게 하면서 성별에 따라 격리된 우리에서 사육하였다. 24시간 명암 주기, 온도 및 습도를 지속적으로 모니터링하고 제어하였다. 자연의 청각적 배경음 형태 및 자연의 가시적 비디오 강화 형태 둘 다의 추가적 환경 강화를 매일 제공하였다. 모든 원숭이들을 연구 전에 전반적 건강에 대해 스크리닝(screen)하였다.

[0155] I. 샘플 수집

[0156] 20NHS PEG-htCBS C15S와 같은 폐길화된 형태의 htCBS를 주사한 후 혈액을 다양한 시점에서 하악하 샘플링용으로 디자인된 1회용 란셋을 사용하여 의식이 있는 연구 동물의 하악하 정맥으로부터 겔을 함유한 Capiject T-MLHG 리튬 헤파린 튜브(12.5 IU)(Terumo Medical Corporation, 미국 뉴저지주)로 수집해 넣었다. 1200G에서 10분 동안 원심분리한 후 혈액 샘플로부터 혈장을 수집하여 -80℃에서 1.5 mL 튜브 내에 저장하였다.

[0157] J. 약동학

[0158] 약동학적(PK) 파라미터는 곡선을 혈중 효소의 시간 코스 동안 발생하는 흡수 단계, 분포 단계 및 제거 단계에 상응하는 일련의 지수항으로 분석하는 비구획 곡선 스트리핑 모델을 사용하여 계산하였다. 곡선 스트리핑 접근법은 세미로그 플롯의 말단 부분에서의 직선성으로 입증되는 바와 같이 약물의 배치 단계가 명백한 1차 동역학을 따른다고 가정한다. 이러한 계산은 각 투여 경로에 대한 평균 혈장 효소 활성을 사용하는 PK Solutions 2.0(Summit Solutions, 콜로라도주 몬트로즈)을 사용하여 실시하였다. 생체이용률은 SC 또는 IP 경로에 대한 곡선하 면적(AUC)을 IV 투여 후에 관찰된 AUC로 나누어 계산하였다.

[0159] K. NHS 페길화 맵핑을 위한 샘플 제조

[0160] 페길화되지 않은 CBS 대조 그룹을 포함하는 각 샘플(300  $\mu$ g)을 HPLC 물(ThermoFisher)을 이용하여 80  $\mu$ l로 희석시켰다. 이어서, 샘플을 0.24 M CAPS 완충액(Sigma) pH 11.5과 1:1(v/v) 혼합하고 37°C에서 22시간 동안 항온 배양하여 PEG를 제거하였다. 탈-페길화된 샘플을 Amicon Ultra 30K 원심분리 필터(Millipore)로 옮기고 320  $\mu$ l의 8M 구아니딘 HCl 용액(Sigma)을 첨가하였다. 필터를 13,000 rpm에서 10분 동안 스피닝시켰다. 이러한 공정을 완충액 교체까지 2회 반복하고 샘플을 8M 구아니딘 HCl에 첨가하고 잔류 유리 PEG를 제거하였다.

[0161] 샘플을 100 mM Tris의 최종 농도까지 1M Tris HCl(pH 7.5)과 배합하였다. 샘플을 56°C에서 45분 동안 10 mM DTT(Sigma)로 환원시키고 냉각시켰다. 요오도아세트아미드를 30 mM의 최종 농도까지 첨가하고 샘플을 실온에서 1시간 동안 암실에서 항온배양하였다. 이어서, 샘플을 1 M의 구아니딘 농도에 도달하도록 50 mM Tris(pH 7.5) 용액으로 희석하였다. 환원된/알킬화된 샘플을 Asp-N 엔도펩티다제 분해를 위해 사용하였다.

[0162] 2 $\mu$ g의 Asp-N를 100 $\mu$ g의 환원 및 알킬화된 샘플(효소: 단백질 비 = 1:50(w:w))에 첨가하였다. 분해를 37°C에서 밤새 수행하였다.

[0163] L. 조직병리학적 분석을 위한 샘플 제조

[0164] PBS-주사된 또는 20NHS PEG-htCBS C15S와 같은 페길화된 htCBS 접합체 처리된 KO 마우스를 17일 내지 19일째에 희생시키고 간 샘플을 광학현미경에 의한 조직학적 분석용으로 가공하였다. 조직학적 평가를 맹검 방식으로 수행하였다. 간을 떼어내고 PBS(pH 7.4) 중의 4% 파라포름알데히드를 사용하여 24시간 동안 고정시켰다. 조직학용 조직 블록을 손질하고 에탄올 시리즈에 이어서 아세톤, 아세톤-크실렌 혼합물 및 크실렌을 이용하여 탈수시킨 다음, 파라핀에 포매시켰다. 동시에, 파라포름알데히드로 고정시킨 소형 조직 블록(약 4 mm $\times$ 2 mm)을 드라이 아이스로 냉각시킨 석유 에테르 중에서 급속 동결시키고 무극성 지질의 검출을 위해 -50°C에서 저장하였다. 4 $\mu$ m 두께의 파라핀 절편을 크실렌 중에서 탈파라핀화시키고, 이소프로필 알코올 단계 후에 에탄올(96%, 70%, 60%)을 이용하여 재수화시켰다. 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하여 조직병리학적 변화를 평가하였다. 섬유증 검출을 위해 메이슨 트리크롬(Masson trichrome) 염색을 수행하였다. 지방증을 레이카 냉동 절편기(Leica Cryomicrotome)(CM 1850)로 절단한 10  $\mu$ m 두께의 고정-동결된 절편에서 무극성 지질을 검출하기 위한 오일 레드 O 염색을 사용하여 검증하였다. 절편을 검토하고 올리푸스(Olympus) 디지털 카메라(DP70)가 장착된 니콘(Nikon) 광학현미경을 사용하여 사진 촬영하였다.

[0165] 전자 현미경의 경우, 각각의 간의 1/3을 1 내지 2 mm 두께 슬라이스로 절단하여 전자 현미경용으로 가공하고 고정 후 3% 글루타르알데히드에 액침시켰다. 이어서, 샘플을 에폰-아랄다이트(Epon-Araldite) 혼합물에 포매시키고 이중 염색시키고 JEOL 1200 전자현미경을 3000 $\times$ 배율로 사용하여 검사하였다.

[0166] M. 이중-에너지 X-선 흡광광도분석법(DEXA)

[0167] 마우스와 같은 소형 동물의 스캐닝용으로 특수하게 디자인된 PIXImusII DEXA 스캐너(GE Lunar Medical Systems)를 DEXA 분석을 위해 사용하였다. 상기 기기는 말단 조직 추출 절차 전에 마우스의 체성분(체지방량, 체지방량 및 골 밀도)을 빠르고 효율적으로 측정할 수 있다. 위장관으로부터 음식을 제거하기 위해 마우스를 DEXA 측정 전 4시간 동안 절식시켰다. 이어서, 마우스를 60 mg/kg 케타민 및 15 mg/kg 자일라진의 IP 볼루스 주사를 사용하여 마취시키고 DEXA 기기 내의 트레이에 놓았다. 측정이 완료된 후(3 내지 5분), 마우스를 DEXA 기기로부터 꺼내고 조직 추출과 같은 마지막 절차에서 사용하였다.

[0168] N. 현미경에 의한 관찰을 위한 안구 샘플의 제조

[0169] 안구의 벽을 보존하기 위해 마우스를 1x PBS pH 7.4 (4% PFA) 중의 4% 파라포름알데히드를 사용하여 관류 고정시켰다. 안구를 외과술에 의해 조심스럽게 제거하고 4% PFA에 침지시키고, 시신경 바로 아래의 안구 후방에 조심스럽게 작은 구멍을 만들어서, 4°C에서 밤새 고정제가 안구의 내부로 침투하여 구조를 고정시킬 수 있도록 하였다. 샘플을 여과된 1x PBS pH 7.4를 사용하여 3회 세척하였다. 세척 후, 안구의 후방을 섬모체 상피의 수준까지 조심스럽게 절개하여 섬모체소대를 노출시켰다. 샘플을 진탕시키면서 2시간 동안 8% BSA 차단 용액 중에 위치시켰다. 차단 후, 4% BSA에 1:50 희석된 MAGP1 항체(Sigma)를 샘플에 첨가하고 4°C에서 밤새 저장하였다. 다음 날, 샘플을 1 $\times$ PBS pH 7.4를 사용하여 6회 세척하고 알렉사(Alexa) 488 2차 항체(1:200, Invitrogen)를 샘플에 첨가하고 실온에서 진탕하면서 2시간 동안 항온배양하였다. 샘플을 5회 세척하고 15분 동안 메틸그린으로 대조염색하였다. 샘플을 6회 세척하고 15분 동안 메틸그린(핵 염색)으로 대조염색하였다.

[0170] 4% 아가로스를 함유하는 용액을 가열하고 커버 슬립 유리 페트리 접시에 붓고 실온에서 고형화되도록 하였다.

고형화된 겔은 안구용 영상화 챔버로서 사용하였다. 겔에 작은 구멍을 만들어서 안구를 위한 안전한 챔버로서 사용하였다. 섬모체소대를 관찰하기 위해, 상기 챔버를 1x PBS로 충전시키고, 염색된 안구 샘플을 수정체의 후방 표면이 겔판에 접촉하도록 하여 상기 구멍에 위치시켰다. 10× 배율 및 0.7× 줌에서 도립 LSM 510 공초점 현미경을 사용하여 3차원 영상을 생성시켰다.

## [0171] 실시예 2. htCBS 체류 시간

[0172] A. 비변형 htCBS는 짧은 순환계내 체류 시간을 나타낸다

[0173] 순환계로 투여되는 약리학적 활성 물질의 약동학적 특성은 ADME의 천연 기전에 의해 크게 영향을 받는다. 주사된 분자의 신속한 청소율은 치료 효능에 크게 영향을 줄 수 있고 따라서 보다 긴 순환 반감기가 바람직하며, 이는 결국 부작용을 최소화하는 덜 빈번한 투여 또는 더 작은 투여량으로 변환될 수 있다. 혈장 순환에서의 htCBS의 약동학을 측정하기 위해, 5 mg/kg의 단일 투여량을 피하(SC), 정맥내(IV) 또는 복강내(IP) 경로를 통해 C57BL/6J 마우스에 주사하였다. IV 또는 IP 경로를 통한 htCBS의 투여는 주사 후 처음 4시간 동안 가장 높은 비활성 값을 나타냈다(각각 최대 123 mU/μL 및 76 mU/μL까지의 피크 혈장 수준이 관찰됨; 표 2는 곡선하 면적(AUC) 값을 나타낸다). 혈장 샘플로부터 계산된 약동학적 파라미터(표 2)는 htCBS의 반감기가 2.7시간이었음을 나타내고, 이는 대략 6 반감기(20시간 미만) 후에 htCBS 수준이 검출 불가능함을 시사한다.

[0174] htCBS의 생체이용율은 SC 경로의 경우 50%이었고, 이는 SC 전달이 이러한 치료학적 접근법을 위한 임상적 옵션일 수 있음을 시사한다. SC 및 IP 경로에 대한 더 느린 겔보기 반감기(표 2)는 제거 단계 동안 발생하여 평균 체류 시간 및 겔보기 반감기를 연장시키는 느린 흡수 단계로 설명될 수 있지만, 본 목적을 위해 훨씬 더 긴 반감기가 바람직하고 따라서 htCBS의 폐길화된 유도체를 시험하였다.

## 표 2

약동학적 파라미터

약동학적 파라미터	단위	IP	SC	IV
투여량	Mg/Kg	5	5	5
AUC(0-t) (obs 면적)	mU-hr/μL	932.4	500.9	1011
생체이용율	%	92%	50%	-
E 반감기	hr	4.3	6.1	2.7
C <sub>max</sub> (obs)	Mu/μL	75.9	34.5	-
MRT (면적)	hr	7.9	9.5	4.9

[0175] 생체내 htCBS 활성의 빠른 저하는 순환계로부터의 촉진된 청소율에 기인할 수 있고 또한 일단 순환계내 환경으로 도입되면 htCBS의 효소 활성이 상실되는 것에 기인할 수 있다. 후자를 시험하기 위해, 매 24시간마다 활성을 측정하면서 htCBS를 37°C에서 야생형 또는 HO 마우스의 마우스 혈장 중에서 최대 96시간 동안 시험관내 항온배양하였다. 도 1a에 도시된 바와 같이, 어떤 마우스 모델의 혈장 중에서도 최대 72시간의 항온배양 동안 활성의 유의적 상실은 기록되지 않았다. 96시간의 항온배양 후에 25%의 많지 않은 활성 상실이 기록되었다. 게다가, 도 1b에 도시된 바와 같이, SC 주사된 동물로부터의 혈장의 웨스턴 블롯(WB) 분석은 htCBS의 양이 시간의 함수로서 감소되고 따라서 청소율이 혈장에서의 htCBS의 활성 상실보다는 순환계에서의 htCBS 활성의 신속한 상실의 이유가 됨을 보여주었다.

[0177] B. htCBS의 폐길화는 생체내 혈장 반감기를 증진시킨다

[0178] CBS의 약동학에 미치는 PEG 분자의 영향을 측정하기 위해, htCBS를 저분자량(2 kDa) 선형 PEG 및 고분자량(40 kDa) 4개 암 분지형 PEG(각각 ME020MA 및 GL4-400MA로 지정함)로 폐길화시켰다. 표 3에 나타낸 바와 같이, 폐길화는 효소의 비활성에 영향을 미치지 않았다. 표 3은 폐길화된 htCBS 및 폐길화되지 않은 htCBS의 쿠마시-염색된 SDS-PAGE의 결과와 함께 상응하는 비활성 값을 나타내는 것으로, 폐길화가 효소의 활성에 영향을 주지 않음을 나타낸다. 폐길화되지 않은 htCBS와 비교하여 ME200MA-폐길화된 htCBS 또는 GL4-400MA-폐길화된 htCBS를 A에 기재한 바와 같이 마우스(n=4 내지 5)에게 SC 주사하였다.



표 3

활성

시험된 htCBS	비활성
비-PEG CBS	1193
ME-200MA CBS	1184
GL4-400MA CBS	1075

[0179]

[0180]

폐길화된 htCBS(PEGhtCBS)의 5mg/체중(BW) kg의 투여량을 SC 및 IV 경로를 통해 C57BL/6J 마우스에게 투여하고, CBS 활성을 상이한 시점에서 모니터링하였다. 2가지의 실험적 암(n= 각각 5)을 각 주사 경로를 위해 사용하였다. 주사 후 0시간째, 1시간째, 8시간째 및 24시간째에 그룹 1로부터 채혈하고 1시간째, 4시간째, 10시간째 및 48시간째에 그룹 2로부터 채혈하였다.

[0181]

GL4-400MA PEGhtCBS에 대해 도 1b(하단 패널)에 도시된 바와 같이, 혈장 중의 활성은 폐길화되지 않은 대응물과 비교하여 폐길화된 단백질의 경우에 유의적으로 연장되었다. 표 4에 도시된 바와 같이, 반감기는 폐길화되지 않은 htCBS의 경우에는 2.7시간에서 16.7로 증가하였고 각각 ME020MA 폐길화 및 GL4-400MA 폐길화의 경우에는 30.4시간으로 증가하였다.

표 4

약동학적 모델링 결과

약동학적 모델링 결과		폐길화된 htCBS ME020MA		폐길화된 htCBS GL400MA	
파라미터	단위	SC	IV	SC	IV
투여량	Mg/Kg	5	5	5	5
AUC(0-t) (obs 면적)	Mu-hr/μL	1637.0	3193.2	2286.3	2836.5
생체이용률	%	51.2%	-	80.6%	-
E 반감기	hr	15.1	16.7	20.1	30.4
c <sub>max</sub> (obs)	Mu/μL	54.6	-	64.9	-
MRT (면적)	hr	27.0	25.7	37.0	43.1

[0182]

[0183]

이는 단일 투여량 후 노출 시간이 폐길화된 형태의 경우 5배 내지 10배 더 길 수 있음을 의미한다. 추가로, SC 투여 후 생체이용률은 범위가 50% 내지 80%의 범위이며, 이는 SC 경로가 임상 연구에 적합할 수 있음을 시사한다.

[0184]

실시예 3. htCBS의 투여 및 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인의 혈청 수준

[0185]

CBSDH를 위한 htCBS 사용의 궁극적 목표는 독성 tHcy 로드를 저하시켜 시스타티오닌 및 시스테인 수준을 상승시키는 것이다. 이러한 변화들은 CBSDH 증상을 예방하거나 역전시키거나 이의 개시를 지연시킬 것으로 예상된다. 그러나, 호모시스틴뇨증 조사는 적합한 동물 모델의 부족으로 인해 지장을 받았다. 마우스 유전자에 대해 완전히 녹아아웃된 마우스는 출생 후 2 내지 3주 이내에 사망하였다. H0(인간 단독) 마우스는 다른 녹아아웃 마우스와 상이한데, 그 이유는 마우스 유전자가 녹아아웃된 것 외에도 H0 마우스가 성체까지 생존할 수 있게 하는 낮은 수준의 인간 유전자를 발현하기 때문이다(참조: Maclean *et al.*, 2010b. *Mol. Genet. Metab.* 101, 153-162). H0 마우스는 Hcy, 메티오닌, S-아데노실메티오닌 및 S-아데노실호모시스테인의 심각한 상승을 나타내고 부수적인 시스테인의 혈장 및 간 수준의 감소를 나타낸다. 따라서, 이들 마우스는 몇가지 측면에서 인간에서 발생하는 질환을 재현하는 특징들을 나타낸다.

[0186]

A. htCBS 투여는 tHcy 및 시스타티오닌 농도를 개선시키지 않는다

[0187]

1주차 및 3주차(치료 세트 간에 10일)에 폐길화되지 않은 htCBS가 5mg/kg에서 5일 동안 연속하여 투여된 H0 마우스는 혈청 호모시스테인 수준의 변화를 나타내지 않았다. 도 2는 H0 마우스에서의 평균 호모시스테인 및 시스타티오닌 수준을 도시한다. 이러한 폐길화되지 않은 htCBS에 의한 대사적 조정의 부족은 폴리에틸렌 글리콜 분

자의 가교 결합에 의해 htCBS를 변형시켜야 할 필요성을 추가 확인시켜 준다.

[0188] PEG의 몇가지 상이한 화학을 국제 공개공보 제W02014120770호(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)(표 5 참조)에 기재된 바와 같이 시험하였고, 데이터는 20 kDa 미만의 PEG로 폐길화된 CBS가 보다 고 분자량의 PEG로 폐길화된 CBS보다 더 빠른 혈장에서의 활성 상실을 나타냄을 보여준다. 이러한 이유 때문에, ME200MA0B로 지정된 선형 20 kDa PEG를 추가 분석을 위해 선택하였다. 도 3은 ME200MA0B로의 htCBS 폐길화의 시간 코스를 나타내는 쿠마시-염색된 SDS-PAGE를 제시한다. PEG를 첨가하여 폐길화 반응을 개시하였고 샘플을 분석될 표시된 시점에서 튜브로부터 회수하였다.

## 표 5

PEG 화학 평가

PEG 분자	구조	표적 그룹	크기 (kDa)
ME020MA	선형	-SH	2
ME050GS	선형	-NH <sub>2</sub> , -OH, -SH	5
ME200GS	선형	-NH <sub>2</sub> , -OH, -SH	20
ME200MA0B	선형	-SH	20
ME400MA	선형	-SH	40
GL2400MA	2개 암	-SH	40
GL4400MA	4개 암	-SH	40
GL2800MA	4개 암	-SH	80

[0189]

[0190] B. 반복된 PEGhtCBS 투여는 tHcy 및 시스타티오닌 농도를 개선시키고 정상 시스테인 수준을 복구시킨다.

[0191] PEGhtCBS 투여의 장기간 효과를 HO 마우스를 사용하여 모니터링하였다. PEGhtCBS 효소를 7.5 mg/kg의 투여량에서 처음 2주 동안 주 2회(월요일 및 화요일)로 8마리의 HO 마우스에게 투여하고 이어서 6주 동안 주 3회(월요일, 수요일 및 금요일)로 투여하였다. 혈액 샘플을 주사 후 24시간째(화요일) 및 72시간째(월요일)에 수거하였다(도 4a 내지 4c). 도 4a는, 혈장 tHcy가 시간 0에서의 212  $\mu$ M로부터 주사 후 24시간째에서의 62 내지 103  $\mu$ M의 범위의 평균치로 감소되었고 마지막 매주 주사 후 72시간째에 141 내지 189  $\mu$ M의 범위에 있었음을 도시한다. 28일째부터, 주사 후 72시간째에 값은 시간 0 값보다 유의적으로 낮았다( $P \leq 0.02$ ). 시스타티오닌 및 시스테인 수준도 역시 긍정적인 영향을 받았다. 시스타티오닌은 6  $\mu$ M로부터 30  $\mu$ M만큼 높은 수준으로 증가되었고 시스테인은 주사 후 24시간째에 계속해서 200  $\mu$ M를 상회하였다(도 4c). 흥미롭게도, 24일째부터 시스타티오닌 농도의 변동은 처음 3주 동안의 처리와 비교해 훨씬 덜 뚜렷하였다. 혈장 대사산물 수준의 분석 외에도, 주사된 마우스로부터의 간, 신장 및 뇌 조직 샘플을 또한 분석하여 비-단백질 결합된 호모시스테인(유리 및 디설파이트-연결된 형태)의 수준을 측정하였다. 도 4d에 도시된 바와 같이, 장기간 주사된 동물에서 각각 간, 신장 및 뇌 조직에 대해 44%, 63% 및 47%의 감소가 나타났다. 따라서, 장기간 반복된 PEGhtCBS 주사는 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인 혈장 수준에 유의적으로 영향을 준다.

[0192] **실시예 4. htCBS 돌연변이체(C15S)는 바람직한 응집 및 폐길화 패턴을 나타낸다**

[0193] A. C15S 돌연변이된 htCBS는 응집을 나타내지 않고 균일한 폐길화 패턴을 나타낸다

[0194] htCBS 효소는 전체길이 단백질과 비교해 응집 경향이 덜한 것으로 이미 보고되었지만(참조: Frank *et al.*, 2006, *Biochemistry* 45:11021-11029), htCBS 효소는 여전히 사량체 및 그 이상의 고차 응집체를 형성한다. 이는 면역 방어 기전을 자극할 있고, 예를 들면, 아밀로이드 침착(참조: D'Souza *et al.*, 2014, "Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation. The official journal of the International Society of Amyloidosis" 21:71-75)을 초래할 뿐만 아니라 정제, 취급 및 일관성에도 영향을 준다. 도 5a(W02014120770(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)의 도 5A로서 이미 개시되어 있음)는 htCBS의 상이한 변형들이 다양한 정도의 고차 응집체와 함께 상이한 이량체/사량체 비를 나타냈음을 보여주는 쿠마시-염색된 네이티브(native)-PAGE를 도시한다. 도 5b(W02014120770(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)의 도 5B로서 이미 개시되어 있음)는 이들 응집체가 CBS 활성을 나타냄을 입증하는 겔내 활성 검정

이다. 도 5c(WO2014120770(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)의 도 5C로서 이미 개시되어 있음)는 응집이 일관되지 않는 폐길화 생성물을 유발함을 도시한다. 폐길화는 2개의 별개의 밴드를 야기하였으며, 응집이 이용가능한 폐길화 부위를 모호하게 만드는 작용을 할 수 있기 때문에 상기 2개의 밴드는 아마도 다양한 정도의 폐길화를 반영할 것이다. 따라서, 배치 28(도 5a)의 보다 뚜렷한 응집으로 인해, 이의 폐길화는 SDS-PAGE상에서 보다 뚜렷한 하단 밴드, 즉 더 적은 폐길화를 야기하였으며(도 5c), 반면에 사랑체와 이량체 둘 다로 구성된 배치 112의 폐길화(도 5a)는 배치 28과 비교해 보다 뚜렷한 상단 밴드를 야기하였다(도 5c). 도 5d는 두 효소 배치 모두와 환원제 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)의 항온배양이 훨씬 많은 사랑체 및 그 이상의 고차 응집체를 이량체 형태로 전환시켰음을 나타내는 쿠마시-염색된 네이티브 겔을 도시한다. 이들 데이터는 응집이 htCBS의 표면에 노출된 시스테인에 의해 유도됨을 시사한다. 따라서, 보다 많은 이량체가 보다 고차 MV 형태로부터 생성되어 htCBS의 표면상의 추가 폐길화 부위의 노출을 야기하기 때문에, TCEP 처리는 보다 광범위한 폐길화를 또한 야기할 것으로 믿어졌다. 실제로, 도 5e에 도시된 바와 같이, 쿠마시-염색된 SDS-PAGE상의 상단 폐길화 밴드와 하단 폐길화 밴드 간의 비는 TCEP 부재하의 폐길화와 비교하여 TCEP 처리 후에 상단 밴드쪽으로 유의적으로 이동된다. 따라서, htCBS 응집은 분자내 디설파이드 브릿지의 형성에 의해 적어도 부분적으로 유도되는 것으로 믿어진다. 따라서, C15를 세린으로 돌연변이시켜 C15S htCBS 돌연변이체를 생성시켰다; C15는 CBS의 표면에 가장 반응성 시스테인인 것으로 이미 제시되었다(참조: Frank *et al.*, 2006, Biochemistry 45:11021-11029). 도 5f(WO2014120770(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)의 도 6A로서 이미 개시되어 있음)는, 2개의 주요 밴드(이량체 및 사랑체)가 htCBS에 대해 관찰된 반면에 C15S htCBS 돌연변이체는 예상대로 TCEP 처리에 의해 영향을 받지 않은 단일 밴드를 나타내는 쿠마시-염색된 네이티브 겔을 도시한다. 이러한 관찰은 HPLC 크기 배제 크로마토그래피(HPLC-SEC)에 의해 추가로 입증되었다. CBS 체제를 Yarra SEC-3000, 300\*7.8 mm 크기 배제 컬럼(Phenomenex, 미국 캘리포니아주)에서 분리시켰다. 상기 컬럼을 보정하고 실온에서 100 mM 인산나트륨 pH=6.8 중에서 1 ml/분의 유속으로 작동시켰다. HPLC-SEC 분석인 도 5g(WO2014120770(이의 내용은 그 전체가 본원에서 참조로 포함된다)의 도 7A 및 7B로서 이미 개시되어 있음)는 htCBS C15S(도 5g, 좌측 패널) 및 htCBS 이량체/사랑체 비(도 5g, 우측 패널)의 차이를 도시한다. 이량체 C15S htCBS 돌연변이체에 대한 단일 피크는 8.62분에서 용출된 한편, htCBS에 대한 주요 피크는 7.9분에서 용출되었으며, 이는 사랑체에 상응한다. 도 4h는 상이한 배치들 간의 htCBS C15S 폐길화의 재현성 및 htCBS와의 비교를 보여주는 쿠마시-염색된 SDS-PAGE 겔을 도시한다. C15S htCBS에서의 응집체 부재는 상이한 배치들 간에 보다 일관된 폐길화 패턴을 야기하였는데, 거의 전적으로 하나의 폐길화된 밴드만이 SDS-PAGE상에서 나타난다. 생체내 및 시험관내 둘 다에서의 PEGhtCBS와 PEGC15S 간의 직접적 비교는 성능에 있어 차이가 없음을 보여주었다.

[0195] PEGC15S가 대사산물에 미치는 효과를 또한 주사 후 1시간째, 4시간째 및 24시간째에 시험하였다(도 6a 내지 도 6c). 7.5 mg/kg의 PEGC15S 또는 PBS(n=5)가 주사된 HO 마우스에서 tHcy(도 6a), 시스타티오닌(도 6b) 및 시스테인(도 6c) 수준을 측정하였다. 데이터는 평균±SEM으로서 제시하며, 각각의 시점을 언페어드 스튜던트 t검정(unpaired Student's t test)을 사용하여 두 그룹들 간에 비교한다. \*p=0.05, \*\*p ≤ 0.01 및 \*\*\*p ≤ 0.001. tHcy 및 시스테인에 미치는 효과는 주사 후 오직 24시간째에만 관찰되었지만(도 6a 및 도 6c), 시스타티오닌의 유의적 증가는 주사 후 1시간째 및 4시간째에 이미 관찰되었다(도 6b).

[0196] **실시예 5. PEGC15S 및 베타인은 생체내에서 상승작용적으로 작동한다**

[0197] 베타인 및 병용 요법의 효과를 평가하기 위해, 베타인, PEGC15S, 및 베타인 처리+PEGC15S 처리의 병용을 실시하였고, 황전이 경로의 대사산물들을 비교하였다.

[0198] 베타인 그룹 및 베타인+PEGC15S 그룹을 18일의 실험 기간 내내 음용수 중의 2% 베타인으로 처리하고, 후자 그룹에게는 14일째 및 15일째에 7.5mg/kg PEGC15S를 주사하였다. PEGC15S 단일 처리 그룹은 일반적인 물로 유지시켰고 14일째 및 15일째에도 주사하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 14일의 베타인 처리는 베타인 처리된 그룹의 경우 tHcy의 29% 및 32% 감소를 야기하였다. 베타인 단일 처리 그룹은 18일째까지 이러한 tHcy 수준을 유지하였다. 베타인 배경하의 PEGC15S 주사는 각각 15일째, 16일째, 17일째 및 18일째에 74%, 77%, 76% 및 40%의 보다 뚜렷한 감소를 야기하였다. 단독의 PEGC15S로의 처리는 각각 15일째, 16일째, 17일째 및 18일째에 69%, 67%, 52% 및 33%의 감소를 야기하였다. 이들 데이터에 따르면, 베타인 처리 존재 또는 부재하의 PEGC15S 주사는 단독의 베타인 처리보다 훨씬 더 우수하다. 또한, 베타인+PEGC15S의 병용은 단독의 PEGC15S 처리보다 우수하였다. 도 7b에 도시된 바와 같이, 이들 두 그룹 간의 차이는 2차 주사 후 48시간째(17일째)에 통계적으로 유의적이었다. 따라서, PEGC15S와 베타인의 병용은 연장된 기간 동안 보다 낮은 tHcy 수준을 유지할 수 있도록 한다.

[0199] 단독의 베타인 처리는 18일의 실험 기간 내내 시스타티오닌의 증가를 야기하지 않았다. 반대로, (베타인 존재 또는 부재하에) PEGC15S로 처리된 두 그룹의 경우에 증가가 관찰되었다. 흥미롭게도, PEGC15S와 베타인의 병용

은 증가를 야기하였으며, 이러한 증가는 16일째에 시작하여 PEGC15S 단일 요법을 받은 그룹보다 유의적으로 더 낮았다. 이것은 단독의 PEGC15S 처리가 호모시스테인을 세린과의 축합으로 보내서 시스타티오닌을 형성한다는 사실 때문이다. 베타인과의 병용은 이용가능한 호모시스테인의 일부를 제메틸화 경로를 통해 보내서 메티오닌을 생산하고, 따라서 PEGC15S의 경우, 시스타티오닌으로 전환되는데 더 적은 호모시스테인이 이용가능할 수 있다.

[0200] 실시예 6. PEGC15S는 조기 사망으로부터 KO 마우스를 구제하고 간 질환을 개선시킨다

[0201] A. 조기 사망의 감소

[0202] 대다수의 완전한 CBS-녹아웃 마우스(KO)는 출생 후 2 내지 3주 이내에 사망한다. PEGC15S가 주 2회 주사된 KO 마우스 대 PBS가 주사된 마우스의 카플란 메이어(Kaplan Meyer) 생존 곡선을 플롯팅하였다. 마우스는 21일째까지 베타인 물에서 유지시켰고, 주사된 효소가 새끼 KO 마우스를 구제하는 능력을 시험하였다. 새끼 KO 마우스에게 PEGC15S 또는 PBS를 주 2회 주사하였다. 모든 마우스는 21일째(이유식일)까지 음용수 중 베타인을 섭취하였다. 도 8a에 도시된 바와 같이, 21일째에, 효소가 주사된 마우스의 98%가 생존한 것과 대조적으로 PBS-주사된 그룹에서는 마우스의 오직 18%만이 생존하였다. 효소-주사된 그룹의 경우에 86% 생존이 기록된 반면에 PBS-주사된 동물은 24일째까지 생존하지 않았다. 하기 추가 실시예(예를 들면, 도 11a 및 11c)에 나타난 바와 같이 상이한 PEG 분자 및 투약 용법의 사용이 이러한 결과들에 큰 영향을 주는 것으로 관찰되었지만, 24일째부터는 효소-주사된 동물의 수도 역시 감소하기 시작하였으며 생존율은 29일째에 45%이고 35일째에 33%였다.

[0203] B. 간 질환

[0204] KO 마우스가 중증 간 손상을 앓는다는 것은 이미 입증되었다(참조: Maclean *et al.*, 2010a, *Mol. Genet. Metab* 101, 163-171; Watanabe *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:1585-1589). 따라서, KO 마우스의 연장된 생존은 CBS 처리 후 간 질환의 개선과 상관관계가 있을 수 있다. 따라서, 35일 동안 PEGC15S가 주사된 동물로부터의 간 절편의 조직학적 분석을 수행하였다. 동물들을 36일째에 희생시키고 간 샘플을 광학 현미경에 의한 조직학적 분석용으로 가공하였다. PBS-주사된 동물들은 35일째까지 생존하지 않았지만, 간 샘플을 사망 직후 2마리 동물로부터 채취하고 가공하였다. 실험은 맹검 방식으로 수행하였다. 간을 떼내어 PBS(pH 7.4) 중의 4% 파라포름알데히드로 24시간 동안 고정시켰다. 조직화용 조직 블록을 손질하고 에탄올 시리즈에 이어서 아세톤, 아세톤-크실렌 혼합물 및 크실렌을 이용하여 탈수시킨 다음, 파라핀에 포매시켰다. 동시에, 파라포름알데히드로 고정시킨 소형 조직 블록(약 4 mm×2 mm)을 드라이 아이스로 냉각시킨 석유 에테르 중에서 급속 동결시키고 무극성 지질의 검출을 위해 -50℃에서 저장하였다. 4μm 두께의 파라핀 절편을 크실렌 중에서 탈파라핀화시키고, 이소프로필 알코올 단계 후에 에탄올(96%, 70%, 60%)을 이용하여 재수화시켰다. 조직 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하여 조직병리학적 변화를 평가하였다. 섬유증 검출을 위해 메이슨 트리크롬 염색을 수행하였다. 지방증을 레이카 냉동절편기(Leica Cryomicrotome)(CM 1850)로 절단한 10μm 두께의 고정-동결된 절편에서 무극성 지질을 검출하기 위한 오일 레드 O 염색을 사용하여 검증하였다. 절편을 검토하고 올림푸스(Olympus) 디지털 카메라(DP70)가 장착된 니콘(Nikon) 광학현미경을 사용하여 사진 촬영하였다.

[0205] 도 8b는 35일째에 희생시킨 2마리의 PEGC15S-주사된 KO 마우스의 간 조직학을 17일째 및 24일째(헤마톡실린 및 에오신 염색)에 사망한 2마리의 PBS-주사된 KO 동물로부터의 간과 대비하여 도시한다. 간 실질의 저배율 사진(도 8b, 좌측 컬럼)은, PBS-주사된 KO에서의 간세포의 대량 구역 괴사(도 8b, KO-3, 화살표로 표시됨) 및 다수의 분산된 괴사를 갖는 미만성 지방증(도 8b, KO-4, 화살표로 표시된 괴사)과 대조적으로, PEGC15S-주사된 KO-1 및 KO-2에서의 다소 불규칙한 간 세포 플레이트 및 경도 내지 중등도 지방증과 중간 정도의 변화를 나타낸다. 간세포의 세포질 내의 무극성 지질의 특이적 염색은 삽도로 나타낸다. 고배율 사진(우측 컬럼)은 PEGC15S-주사된 KO에서의 빈번한 유사분열(화살표로 표시하며 삽도에 상세히 도시되어 있음) 및 인이 현저한 비대한 다형태 핵의 존재를 입증한다. PBS-주사된 KO의 간 실질의 고배율 사진은 희박한 염증성 침윤을 갖는 융합성 간세포 괴사(도 8b, KO-3, 화살표로 표시됨) 또는 두드러진 흡수성 염증 반응을 동반한 다수의 분산된 괴사(도 8b, KO-4, 화살표로 표시됨)를 입증한다. 나머지 간 실질은 PBS-주사된 KO에서의 미세세포 및 거대세포 지방증을 나타낸다. (PT = 문맥관, CV = 중심 정맥).

[0206] PBS-주사된 동물에서는 뚜렷한 미세세포 내지 거대세포 지방증 및 간세포의 유의적 사멸을 특징으로 하는 중증 간병증이 발달하였으며 섬유증이 최소로 있거나 섬유증이 없었다. 뚜렷한 염증성 흡수성 반응을 동반한 간소엽 전반에 걸쳐 분산된 간세포의 다수의 단일세포 또는 올리고세포(oligo cellular) 괴사가 1마리의 동물에서 발견된 반면에, 다른 동물에서는 희박한 염증성 침윤물을 갖는 주로 문맥주위 구역에서의 간세포의 대량 융합성 괴사가 우세한 특징이다. 간 실질 재생의 징후는 2마리 동물 모두에서 최소였다. 2마리의 PEGC15S-주사된 동물들은 실질 손상의 징후는 경미하지만 재생은 뚜렷한 중간정도의 간 변화를 나타냈으며 검사자에 의해 요법을 받은



것으로 정확히 인식되었다. 간 실질 재생을 나타내는 변화(간 소엽의 다소 불규칙한 구조, 간세포의 호염기성 세포질, 빈번한 유사분열 및 이핵 간세포, 핵 다형성 및 인이 뚜렷한 비대화)는 가장 눈에 잘 띄는 특징이었다. 전체적 형태학은 간세포의 증가된 증식, 전사 및 번역과 일치하였다. 게다가, 간세포의 드문 국소 괴사 및 미세 소포 유형의 경미한 지방증이 검출되었으며 섬유증은 최소화였다.

#### [0207] 실시예 7. 20NHS PEG-htCBS C15S의 생화학적 특징

[0208] 20NHS PEG-htCBS C15S의 생화학적 특징을 분자의 생체내 투여의 효과에 대한 연구 전에 측정하였다.

[0209] A. N-말단 서열 분석 및 고유 질량(intact mass) 분석

[0210] 비변형 htCBS C15S의 5개 बै치를 N-말단 서열 분석을 사용하여 분석하였다. 모든 बै치들에 대해 수득된 서열들은 동일하였으며 참조 서열과 비교하였고, 서열들은 초기 메티오닌 잔기가 결여되었다. htCBS C15S의 N-말단은 PSETP이고 야생형 CBS의 서열에서 발견되는 바와 같은 MPSETP는 아닌 것으로 관찰되었다.

[0211] 디콘볼루션된(deconvoluted) 질량 스펙트럼에 의해 측정된 htCBS C15S의 고유 질량은 5개의 बै치에서 45290 Da에서의 단지 하나의 주요 피크를 동정함으로써 N-말단 서열분석으로부터의 결과를 확증하였다. 상기 값은 N-말단 메티오닌이 없는 htCBS C15S 단량체(이론적 분자량: 45289.7 Da)의 분자 질량에 부합한다.

[0212] Geneious 정렬 유형 "Global alignment with end gaps" 및 Cost Matrix Blosom62을 사용하여 소프트웨어 Geneious 9.1.5(무료 버전)에 의해 서열 정렬을 추가로 수행하여, 인간, 래트, 원숭이 및 마우스의 htCBS C15S의 단백질 서열들을 비교하였다. 결과는 20NHS PEG-htCBS C15S의 N-말단이 PSETP이며 인간, 래트, 원숭이 및 마우스의 절두형 야생형 CBS의 서열에서 발견되는 바와 같은 MPSETP가 아님을 확인시켜 주었다. htCBS C15S는 (출발 코돈에) 1개의 갭을 포함하여 절두형 원숭이 CBS와 96% 서열 동일성을 공유하는 것으로 관찰되었다. UniProtKB/Swiss-Prot에 기초하여, 본원에서 사용된 htCBS C15S 및 절두형 원숭이 CBS에서 다음과 같은 서열들 간의 차이가 관찰되었다: Q58H57. 아미노산 위치(서열의 정렬에 기초하여) 18R→L(본원에서 사용된 htCBS C15S→절두형 원숭이 서열), 위치 25 K→Q, 위치 32 S→L, 위치 34 E→G, 위치 69 A→V, 위치 71 A→E, 위치 90 V→I, 위치 133 D→A, 위치 157 A→T, 위치 242 Q→R, 위치 354 V→M 및 위치 403 T→V.

[0213] htCBS C15S는 (래트 서열 내에) 5개의 갭을 포함하여 절두형 래트 CBS와 84% 서열 동일성을 공유하는 것으로 관찰되었다. UniProtKB/Swiss-Prot에 기초하여, 본원에서 사용된 htCBS C15S 및 절두형 래트 CBS로부터 다음과 같은 서열들 간의 차이가 관찰되었다: P32232. 아미노산 위치(서열의 정렬에 기초하여) 4 E→G(본원에서 사용된 htCBS C15S→절두형 래트 서열), 위치 6 P→S, 위치 8 A→C, 위치 10 V→D, 위치 12 P→S, 위치 13 T→A, 위치 15 S→C, 위치 17 내지 24 HRSGPHSA→QDLEVPQE, 위치 26 S→Q, 위치 32-34 SPE→ASG, 위치 38-42 AKEPL→R---V, 위치 45 R→S, 위치 48 A→T, 위치 60 내지 62 ASE→MAD, 위치 66 H→Y, 위치 69 A→V, 위치 71 A→T, 위치 82 K→R, 위치 86 D→N, 위치 94 K→R, 위치 96 G→S, 위치 98-99 KF→NA, 위치 133 D→A, 위치 161 R→K, 위치 175 S→M, 위치 235 T→D, 위치 238 D→E, 위치 248 L→V, 위치 255 V→A, 위치 276 R→K, 위치 300 T→A, 위치 318 T→A, 위치 322 K→R, 위치 329-331 EEA→DDS, 위치 333 T→A, 위치 340 및 350 A→S, 위치 353-354 TV→AM, 위치 365 Q→K, 위치 383 T→S, 위치 389 R→K, 위치 397 L→M, 위치 401 D→-, 위치 403-404 TE→SV 및 위치 406 K→R.

[0214] htCBS C15S는 (마우스 서열 내에) 5개의 갭을 포함하여 절두형 마우스 CBS와 84% 서열 동일성을 공유하는 것으로 관찰되었다. UniProtKB/Swiss-Prot에 기초하여, 본원에서 사용된 htCBS C15S 및 절두형 마우스 CBS로부터 다음과 같은 서열들 간의 차이가 관찰되었다: Q91W9. 아미노산 위치(서열의 정렬에 기초하여) 4 E→G(본원에서 사용된 htCBS C15S→절두형 마우스 서열) 위치 6 P→S, 위치 8 A→C, 위치 10 V→D, 위치 12-13 PT→SA, 위치 15-21 SPHRSGP→GFQHLDM, 위치 24 A→E, 위치 26-27 GS→RQ, 위치 32-34 SPE→PSG, 위치 37-42 EAKEPL→DR---V, 위치 48 A→T, 위치 59-62 PASE→AMAD, 위치 66 H→Y, 위치 69-71 APA→VLT, 위치 82 K→R, 위치 86 D→N, 위치 96 G→S, 위치 98-99 KF→NA, 위치 133 D→A, 위치 161 R→K, 위치 175 S→M, 위치 235 T→D, 위치 238 D→E, 위치 255 V→A, 위치 276 R→K, 위치 300 T→A, 위치 318 T→A, 위치 330-331 EA→DS, 위치 333 T→A, 위치 350 A→S, 위치 353-354 TV→AM, 위치 383 T→S, 위치 389 R→K, 위치 397 L→M, 위치 401 D→-, 위치 403-404 TE→SV, 위치 406 K→R 및 위치 411 H→R.

[0215] 상기 결과는 래트 및 마우스 서열이 본원 실시예에서 사용된 20NHS PEG-htCBS C15S로 폐길화된 htCBS C15와 비교하여 다수의 동일한 차이를 공유함을 보여준다. 절두형 원숭이 서열은 20NHS PEG-htCBS C15S의 서열과 가장 큰 유사성을 공유하였다.

[0216] B. PEGC15S의 NHS 에스테르 폐길화 맵핑

[0217] 20NHS PEG-htCBS C15S의 3개 룯트의 폐길화 부위를 맵핑하였다: RC-6-67A(6.3 mg/ml), RC-6-67B(6.7 mg/ml) 및 RC-8-14(3.8 mg/ml). 샘플을 알칼리에서 탈-폐길화시키고 환원시키고 알킬화시키고 Asp-N 엔도펩티다제로 분해시키고 LC/UV/MS로 분석하였다.

[0218] 역상 크로마토그래피를 60℃의 컬럼 온도에서 XBridge BEH130 C18 3.5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 150 mm 컬럼(Waters)을 이용하여 수중 0.1% TFA(ThermoFisher)의 이동상 A 및 아세토니트릴(Burdick and Jackson) 중의 0.1% TFA(ThermoFisher)에서 33 $\mu$ g의 주입량에 대해 수행하였다. 표 6은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 대한 구배를 나타낸다.

표 6

HPLC 구배

시간(분)	용매 B%	유속 (mL/분)
0	3	0.5
6	3	0.5
51	25	0.5
87	34	0.5
98	45	0.5
99	98	0.5
104	98	0.5
105	3	0.5
120	3	0.5

[0219]

[0220] ESI-QTOF 질량 분석기(Agilent, 모델 6538)를 LC/UV/MS 전에 Agilent 보정 튜빙 믹스를 사용하여 고분해능 4GHz 및 330 내지 3200 m/z의 MS 스캔 범위를 갖는 양이온 모드로 설정하였다. 전압은 다음과 같이 설정하였다: 프래그멘터 -250 V, 스키머 -65 V 및 8중극자 RF 전압 750 V. 가스 온도는 350℃였다. 모든 질량은 시험이 진행되기 전에  $\pm$  1ppm 이내가 되도록 보정하였다. 모든 LC/MS/MS 실험 기간 내내 참조 기준의 연속적 주입에 의해 동적 질량 축 보정을 또한 사용하였다. 잠금 질량 이온(lock mass ion)을 사용하였다: 922.009798.

[0221] 폐길화되지 않은 htCBS C15S 단백질을 대조 그룹으로서 동시에 가공하였다. 펩타이드 맵은 각각의 4개 샘플에 대해 모든 30개의 라이신 잔기를 포함하여 아미노산 서열의 97.8%를 포함하는 것으로 관찰되었다. 1 내지 2 PEG 링커의 질량 첨가에 기초하여 12개의 펩타이드가 폐길화된 것으로 동정되었고, 폐길화 정도는 이들 3개의 룯트에 대해 4.5 내지 5.5 PEGs/CBS 서브유닛의 범위 내에 있는 것으로 추정되었다.

[0222] 샘플을 먼저 LC/MS/MS에 의한 폐길화된 htCBS C15S의 폐길화 부위-점유 분석에서 최적화된 조건(pH 11.5, 37℃, 22시간)하에 탈-폐길화시켰다. 탈-폐길화 후, 이전에 폐길화된 부위를 펩타이드 맵핑에 의해 동정될 수 있는 화학식 C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>(114.0317 Da의 단동위분자량)의 링커와 함께 남긴다. 탈-폐길화된 샘플을 상기 기재한 바와 같이 환원시키고 알킬화시키고 Asp-N 엔도펩티다제로 분해시키고 LC/UV/MS에 의해 분석하였다.

[0223] 폐길화 정도는 다음 계산식을 사용하여 추정하였다: 펩타이드당 PEG의 수 = (존재비(1\*링커) + 2 $\times$ 존재비(2\*링커)) / (존재비(링커 없음) + 존재비(1\*링커) + 존재비(2\*링커)). 표 7은 LC/UV/MS 결과를 제공한다.

표 7

추정된 PEG/펩타이드에 의해 측정된 3 개 샘플에서의 폐길화 정도

펩타이드	추정된 PEG/펩타이드		
	RC-6-67A	RC-6-67B	RC-8-14
2-34	1.06	1.24	1.29
9-34	0.84	0.98	1.03
35-46	0.17	0.18	0.22
47-78	0.26	0.31	0.37
79-85	0.02	0.03	0.03
86-106	0.54	0.61	0.63
198-220	0.02	0.03	0.03
245-248	0.39	0.48	0.49
270-301	0.27	0.29	0.39
321-327	0.21	0.21	0.31
388-400	0.04	0.05	0.05
401-413	0.59	0.71	0.74

[0224]

[0225]

라이신 25번, 30번, 211번, 247번, 271번 및 405번 내지 406번은 모든 3개의 20NHS PEG-htCBS C15S 배치들에서 어느 정도까지 폐길화된 것으로 명백히 동정되었다. 라이신 72번 및 75번; 82번 및 83번; 94번, 97번 내지 98번 및 102번; 322번 및 325번; 및 394번 및 398번의 그룹 각각은 동일한 펩타이드 내에 있으며, 본원의 분석은 어떤 라이신이 어느 정도까지 폐길화되었는가를 측정할 수 없었다.

[0226]

탈-폐길화 동안 단백질의 염기성 가수분해에 기인할 수 있는 Asp-N 엔도펩티다제(Asp 및 Glu의 N-말단)에 특이적이지 않은 일부 펩타이드 절단, 예를 들면, 107 A-K 119 및 333 A-K 348도 또한 관찰되었다. 일부 펩타이드 경우 현저한 비율의 탈아미드화가 관찰되었으며, 이는 또한 탈-폐길화 반응을 위해 사용된 알칼리성 조건에 기인할 수 있다.

[0227]

**실시예 8. 말레이미드 폐길화의 생화학적 특징규명**

[0228]

SDS-PAGE 및 네이티브 PAGE 겔을 수행하여 ME-400MA 및 ME-200GS에 접합된 htCBS에 대한 폐길화 패턴의 재현성을 비교하였다. 결과는 별개의 PEG-CBS 종들 간의 가변적 비를 나타냈고 ME-400MA의 말레이미드 PEG 분자가 사용될 때 불완전한 폐길화를 나타냈다. NHS 에스테르 PEG ME-200GS에 대한 가변적 폐길화 정도는 SDS-PAGE(도 9a) 및 네이티브 PAGE 겔(도 9b)상에서 분리 불가능한 폐길화된 종의 고분자량 "자국(smear)"을 생성시켰다.

[0229]

htCBS C15S의 ME-200GS로의 폐길화와 달리, htCBS C15S의 ME-400MA로의 폐길화는 네이티브 PAGE상에서 분리되었을 때 3가지의 정의된 종을 생성시키는 것으로 관찰되었다(도 9b). 가장 중질 종들은 ME-200GS로 폐길화된 htCBS C15S에서의 제2 종과 함께 공동-용출된 것으로 관찰되었다. 가장 중질의 종들이 다른 종들과 비교하여 비교적 소량이고 분리 부족으로 인해 상세한 약력학적(PD) 특징 규명이 불가능하였기 때문에, 이러한 가장 중질 종들의 정확한 정체는 결정되지 않았다. 제2 종은 본래의 이량체 내의 각 서브유닛에 부착된 1개의 PEG를 보유하는 것으로 동정되었으며 달리 동종폐길화된(homoPEGylated) 종으로도 공지되어 있다. 가장 경질의 폐길화된 종들은 이량체당 오직 1개 PEG만을 보유하는 것으로 관찰되었으며, 달리 이종폐길화된(heteroPEGylated) 또는 반폐길화된(hemiPEGylated) 종으로도 공지되어 있다.

[0230]

**A. PEGC15S의 말레이미드 폐길화 맵핑**

[0231]

펩타이드 맵핑의 제1 단계는 ME-400MA로 폐길화된 htCBS C15S의 2개 샘플: RC-6-13 POOL1 및 RC-6-13 POOL2 종의 각 시스테인-함유 펩타이드의 해석이었다. RC-6-13 POOL1(BSL 샘플 번호 1127)은 동종폐길화된 종(동일한 잔기상에서 폐길화되었을 가능성이 가장 큼)을 대표한다. RC-6-13 POOL2(BSL 샘플 번호 1128)는 반폐길화된 종을 대표하며, 따라서 SDS-PAGE상에서 거의 동등한 비율의 폐길화된 밴드와 비변형된 밴드인 것으로 관찰되었다. 본 실시예는 접근성이 가장 큰 시스테인(C15)이 세린으로 치환될 때의 ME-400MA의 부착 위치를 결정하였다.

[0232]

Lys-C 분해를 참조 단백질(폐길화되지 않은(UnPEG) RC-6-09 DIAFILTRATE) 및 동시에 2가지의 폐길화된 단백질(RC-6-13 POOL1/ RC-6-13 POOL2)에 대해 수행하였다. 환원된/알킬화된 LC/MS 펩타이드 맵으로부터 8가지의 시스테인-함유 펩타이드가 동정되었다. 하기 표 8에 제시된 바와 같이 7가지의 시스테인-함유 펩타이드는 모든 3가지 샘플에서 유사한 상대적 존재비를 산출하였고, 이는 이들 7가지 시스테인 펩타이드가 폐길화되었을 가능성이 낮음을 나타낸다.

[0233] 오직 1개의 시스테인-함유 펩타이드는 2개의 폐길화된 샘플 각각에서 유의적으로 감소된 상대적 존재비를 갖는 것으로 관찰되었다. 표 8은 각각의 샘플에서 폐길화되지 않은 펩타이드의 상대적 존재비를 제공한다.

표 8

#### 폐길화되지 않은 cys-함유 Lys-C 펩타이드의 상대적 존재비

펩타이드	참조 단백질 상대적 존재비	1127 상대적 존재비	1128 상대적 존재비
40-72	0.40	0.36	0.40
103-108	0.05	0.04	0.04
109-119	0.07	0.06	0.07
120-172	0.15	0.13	0.14
212-247	0.21	0.20	0.21
272-322	0.25	0.08	0.17
326-359	0.14	0.12	0.13
360-384	0.12	0.11	0.12

[0234]

[0235] 펩타이드 272번 내지 322번은 2개의 시스테인 잔기를 함유하는 것으로 관찰되었다. 폐길화된 잔기는 Lys-C 펩타이드 272번 내지 322번상의 Cys272 및/또는 Cys275 잔기에서 관찰되었다. Cys272 및/또는 Cys275가 폐길화되는 것을 추가 구별하기 위해, 2개의 잔기를 상이한 펩타이드로 분리시키고, 참조 단백질(폐길화되지 않은 RC-6-09 DIAFILTRATE) 및 2가지의 폐길화된 단백질(RC-6-13 POOL1/ RC-6-13 POOL2)을 시약 2-니트로-5-티오-시아노벤조산(NTCB)으로 처리하였다. NTCB가 유리 시스테인 잔기에 대한 N-말단을 절단하기 때문에, 폐길화된 시스테인은 시안화된 최종 생성물을 형성하고 앎고 따라서 절단을 차단한다.

[0236]

7가지의 시스테인-함유 펩타이드가 NTCB 처리된 C8 LC-MS 펩타이드 맵으로부터 동정되었다. 화학적 분해 효율은 효소 분해에 비해서 비교적 낮았고, 표적 펩타이드 피크는 크로마토그램에서 작았으며, 부반응도 또한 관찰되었다(결과는 제시하지 앎음). 수동 이온 탐색을 사용하여 시스테인-관련 펩타이드 피크의 정확한 위치를 찾아내고 정량하였다. 참조 단백질과 비교하여, 오직 1개의 시스테인-함유 펩타이드만이 RC-6-13 POOL1 샘플에서 유의적 감소를 나타냈다. 잔기 244번 내지 271번으로서 동정된 펩타이드는, 부위 272번이 차단되어 244번 내지 271번 펩타이드에 대한 수율을 저하시켰음을 의미한다. 2개의 시스테인 함유 펩타이드는 RC-6-13-POOL2 샘플의 경우에 상대적 존재비의 감소를 나타냈고; 그러나, 그 비는 이들 둘 사이에 비슷하다. 두 시스테인 모두가 폐길화에 관여하거나 피크 존재비가 확실한 결론을 도출하기에는 너무 앎을 가능성이 있다. 비록 Cys275가 폐길화의 위치로서 완전히 제외되지 앎았지만, 표 9의 결과는 폐길화 잔기가 Cys272에 있다는 증거를 제공한다.

표 9

#### Cys272와 Cys275의 폐길화의 비교

펩타이드 (아미노산 잔기)	참조 단백질		1127 RC-6-13 POOL1			1128 RC-6-13 POOL2		
	델타 질량 ppm	상대적 존재비	델타 질량 ppm	상대적 존재비	참조 대 샘플의 비	델타 질량 ppm	상대적 존재비	참조 대 샘플의 비
52-102	-1.25	0.006	-1.92	0.0054	1.2	1.45	0.0054	1.2
103-108	-0.57	0.002	-1.86	0.0014	1.6	-3.00	0.0024	1.0
244-271	1.28	0.003	-0.90	0.0011	2.7	1.73	0.0021	1.4
275-345	0.76	0.001	0.64	0.0006	1.6	0.93	0.0007	1.4
370-413	0.67	0.045	-1.28	0.037	1.2	0.31	0.040	1.1

[0237]

[0238] 실시예 9. HO 마우스에서 400MA PEG-htCBS C15S 및 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학 및 약력학

[0239]

본 실시예는 폐길화된 htCBS C15S의 약동학적(PK) 및 약력학적(PD) 특성들을 특징 규명하고 20 kDa 선형 NHS 에스테르-활성화된 PEG(ME-200GS) 또는 40 kDa 선형 말레이미드-활성화된 PEG(ME-400MA)와 비교한다. 각각의 PEGC15S를 DEAE 세파로즈상에서 정제하고 1×멸균 PBS 중의 BioMax® 100 카트리지에서 접선 유동 여과(TFF)를 사용하여 완충액 교체하였다.

[0240]

ME-400MA로 변형된 htCBS C15S(400MA PEG-htCBS C15S)를 7mg/ml로 농축시켰다. ME-400MA로 변형된 동종폐길화



된 htCBS C15S(피크 1)를 4.3 mg/ml로 농축시키고, ME-400MA로 변형된 반/이중폐길화된 htCBS C15S(피크 2)를 5.1 mg/ml로 농축시켰다. ME-200GS로 변형된 htCBS C15S(20NHS PEG-htCBS C15S)를 6 mg/ml로 농축시켰다.

[0241] 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우, HO 마우스에게 5, 10 또는 15 mg/kg 투여량을 SQ 투여하거나 10 mg/kg의 투여량을 IV 투여하였다. 400MA-htCBS C15S의 경우, HO 마우스에게 10 mg/kg의 단일 투여량을 다음 3가지 형태 중 하나로 SC 또는 IV 투여하였다: (i) 개별적 형태들의 분리가 시도되지 않았던 모든 종들의 혼합물(믹스), (ii) 이중폐길화된 종(피크 1) 및 (iii) 이중/반폐길화된 종(피크 2).

[0242] 수컷 HO 마우스와 암컷 HO 마우스 둘 다를 본 실시예에서 사용하고, 각 그룹은 3 내지 4마리의 마우스를 함유하였다. 어느 한 마리 마우스로부터라도 수집된 혈액 용적을 최소화하기 위해 "A" 및 "B"로 지정된 두 마우스 그룹을 각 투여 경로를 위해 사용하였다. SC 투여의 경우, 그룹 A로부터는 주사 후 0.5시간째, 3시간째, 24시간째 및 72시간째에 채혈하고, 그룹 B로부터는 주사 후 1시간째, 6시간째, 48시간째 및 96시간째에 채혈하였다. IV 투여의 경우, 그룹 A로부터는 0.25시간째, 1시간째, 6시간째 및 48시간째에 채혈하고 그룹 B로부터는 0.5시간째, 3시간째, 24시간째 및 72시간째에 채혈하였다.

[0243] A. 약동학

[0244] 시간-활성 곡선으로부터 계산된 PK 파라미터는 ME-200GS 접합체에 대해서는 표 10에 요약되어 있고 ME-400MA 접합체에 대해서는 표 11에 요약되어 있다. 정맥내 그룹에 대한 세미로그 플롯은 직선형이었고 따라서 모든 형태의 htCBS C15S 효소가 1차 동력학에 의해 혈장으로부터 청소되었음을 확인시켰다(데이터는 제시하지 않음).

[0245] SC 또는 IP 경로에 대한 곡선하 면적(AUC)을 IV 투여 후 관찰된 AUC로 나누어 생체이용율을 계산하였다. 표 10은 20NHS PEG-htCBS C15S의 IV 및 SC 투여 후의 PK 파라미터를 제공한다.

표 10

20NHS PEG-htCBS C15S 로 수행된 실험에 대한 PK 파라미터

PK 파라미터	단위	SC	SC	SC	IV
투여량	Mg/Kg	5	10	15	10
AUC(0-t) (obs 면적)	mU-hr/ $\mu$ L	3062 $\pm$ 158	4788 $\pm$ 626	5754 $\pm$ 160	7431 $\pm$ 154
AUC/투여량		612	479	384	
생체이용율	%	82.6%	64.6%	51.6%	NA
E 반감기	hr	137 $\pm$ 95	17.5 $\pm$ 1.27	22.0 $\pm$ 1.7	47.6 $\pm$ 14.6
A 반감기	hr	5.3 $\pm$ 1.1	12.7 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 1.2	NA
c <sub>max</sub> (obs)	mU/ $\mu$ L	51.3 $\pm$ 3.7	89.9 $\pm$ 10.2	104.2 $\pm$ 11.3	371.6 $\pm$ 11.2
c <sub>max</sub> /투여량		10.3	9.0	6.9	
MRT (면적)	hr	194 $\pm$ 128	44.8 $\pm$ 1.7	49.0 $\pm$ 1.4	52 $\pm$ 13
CL (obs 면적)	$\mu$ L/hr	1636 $\pm$ 86	2113 $\pm$ 280	2609 $\pm$ 72	1346 $\pm$ 27.3
정상상태까지의 시간*	hr		343		
SS에서 피크*	mU/ $\mu$ L		162		
SS에서 저점*	mU/ $\mu$ L		85		

[0246]

[0247] \*는 값이 48시간 투약 간격 및 17.5시간 반감기로 10 mg/kg 투여량에 대해 모델링되었음을 나타낸다.

[0248] 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우, 곡선하 면적은 5, 10 및 15 mg/kg 투여량에 대해 각각 3062, 4788 및 5754였다. 혈관외(SC) 투약 후 전신 순환에 도달한 htCBS C15S 효소의 비율은 5 mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S SC 투여량-그룹에서 82.6%였지만, 10 및 15 mg/kg 투여량 그룹에서 64.6% 및 51.6%로 감소되었다. 따라서, 증가는 AUC, c<sub>max</sub> 및 생체이용율의 증가 비율로 반영되는 투여량 비례적이지 않다. 이러한 결과들은 아마도 투여량 증가에 따른 20NHS PEG-htCBS C15S의 총 흡수의 약간의 감소에 의해 설명될 수 있을 것이다.

[0249] IV 투약 그룹의 제거 반감기는 48시간이었으며, 이는 혈장 중 약물 농도의 절반이 48시간마다 청소될 것이라는 것을 의미한다. 본 데이터는 0.98 초과 상관계수로 농도와 시간으로서 로그 스케일상에 플롯팅되었을 때 완전히 직선형이었으며, 상기 상관계수는 이것이 20NHS PEG-htCBS C15S에 대한 제거 반감기의 근접한 추정치임을 시사한다. SC 투약 그룹에서의 반감기 측정치는 가변적이었으며 17.5 내지 137시간의 범위였다. 이러한 추정치들은 느린 2상성 흡수/분포 단계에 의해 교란(confound)되었다. 단일 효소 분자(MRT)의 평균 순환 시간은 20NHS

PEG-htCBS C15S의 경우 44시간 내지 194시간의 범위인 것으로 계산되었다.

[0250] 투약 간격이 48시간이고 반감기가 17.5시간이라 가정하고, 정상 상태(일정한 피크 및 저점 수준)에 도달하기까지의 시간을 10 mg/kg SC 테이터 세트로부터 모델링하였다. 절대 정상상태에 도달하기까지의 시간은 343시간(즉, 매 2일마다 약 7회의 SC 주사 후)인 것으로 추정되었지만, 피크 및 저점 혈장 수준의 변화는 144시간만큼 정상상태 수준에 매우 근접하였다. 정상상태에서, 피크 수준 및 저점 수준을 10 mg/kg 투여량이 SC로 2일마다 1회 투여된 후 162 및 85 mU/ $\mu$ L이 되도록 시뮬레이션하였다. 그러나, 매우 유사한 수준은 주사 후, 즉 2일마다 폐길화된 효소를 3회 SC 투여한 후 144시간 내에 도달하였다.

[0251] 동종폐길화된 종(htCBS이량체당 2개 PEG 모이어티)을 나타내는 피크 1, 반폐길화된 종(htCBS이량체당 1개 PEG 모이어티)을 나타내는 피크 2에 대한 400MA PEG-htCBS C15S의 혈장 수준을 도 10a에서 비교하였다. 믹스는 수집 시점을 나타내는 사각형을 갖는 실선으로서 나타낸다. 피크 1은 수집 시점을 나타내는 원형을 갖는 파선으로 나타내고, 피크 2는 수집 시점을 나타내는 다이아몬드형을 갖는 파선으로 나타낸다.

[0252] 표 11은 10 mg/kg의 400MA PEG-htCBS C15S의 SC 및 IV 투여 후에 계산된 PK 파라미터를 제공한다.

### 표 11

400MA PEG-htCBS C15S 로 수행된 실험에 대한 PK 파라미터

약동학적 파라미터	단위	SC 혼합	SC 피크 1	SC 피크 2	IV 혼합
투여량	Mg/Kg	10	10	10	10
AUC(0-t) (obs 면적)	mU-hr/ $\mu$ L	3805 $\pm$ 656	5193 $\pm$ 519	4201 $\pm$ 436	6888 $\pm$ 268
생체이용률	%	55.2%	NA	NA	NA
E 반감기	hr	83.1 $\pm$ 47	22.0 $\pm$ 5.3	104.9 $\pm$ 122.3	39.0 $\pm$ 12.9
A 반감기	hr	9.4 $\pm$ 14.8	12.1 $\pm$ 1.26	6.3 $\pm$ 5.5	NA
Tmax (또는 IV의 경우 Cp0)	hr	10.5	24	18 $\pm$ 10	NA
c <sub>max</sub> (obs)	mU/ $\mu$ L	75.8 $\pm$ 12.3	94.6 $\pm$ 8.6	75.8 $\pm$ 14.5	330.6 $\pm$ 40.0
MRT (면적)	hr	99.3 $\pm$ 54.0	50.6 $\pm$ 2.57	135 $\pm$ 129	48.2 $\pm$ 11.4
CL (obs 면적)	$\mu$ L/hr	2698 $\pm$ 534	1939 $\pm$ 205	2398 $\pm$ 259	1453 $\pm$ 57.6

[0253]

[0254] 혼합된 400MA PEG-htCBS C15S에 대해 계산된 생체이용률은 55.2%인 것으로 관찰되었다. T<sub>max</sub>는 c<sub>max</sub>(초기 피크 혈장 수준)의 시간이다. 제거 반감기는 IV 테이터셋트로부터 39시간인 것으로 계산되었다. PK 파라미터는 피크 1(반폐길화된) 및 피크 2(동종폐길화된)로서 지정된 개별적 폐길화된 종들마다 상당히 상이하지 않았다.

[0255] B. htCBS C15S의 ME-200GS 및 ME-400MA 폐길화된 형태들의 비교

[0256] PK 파라미터는 본원에서 비교된 htCBS C15S의 2가지 폐길화된 형태(ME-200GS 및 ME-400MA)에 대해 인지할 수 있을 정도로 상이한 것으로 관찰되지 않았다. 각 효소의 10 mg/kg IV 및 SC 투여량에 대한 비활성 대 시간 곡선도 또한 도 10b에 도시된 바와 같이 유사한 것으로 관찰되었다. IV 투약 후의 활성은 실선으로서 나타내며 SC 투약 후의 활성은 파선으로서 나타낸다. 원형(IV) 및 삼각형(SC)은 20NHS PEG-htCBS C15S가 투여된 마우스에 대한 수집 시점을 나타내고, 다이아몬드형(IV) 및 사각형(SC)은 400MA-htCBS C15S가 투여된 마우스에 대한 수집 시점을 나타낸다.

[0257] 그러나, 도 10c에 도시된 대사산물 프로파일은 20NHS PEG-htCBS C15S가 단일 10 mg/kg SC 투약 후 호모시스테인(원형) 및 시스테인(사각형)의 혈장 수준의 정상화 면에서 더욱 효과적이었음을 보여준다. 도 10c의 그래프에서 삼각형으로 표시된 시스타티오닌 수준은 두 접합체들 간에 유의적으로 차이가 없었다. 일반적으로, 반응들은 활성 검정으로 측정된 혈장 수준을 따른다.

[0258] 20NHS PEG-htCBS C15S에 대한 반응은 보다 신속하게 일어나는 것으로 관찰되었고 400MA PEG-htCBS C15S에 대한 반응과 비교해 보다 연장된 것으로 관찰되었다. 두 폐길화된 효소 모두 SC 투여 후 6시간 동안 대략 동일한 정도로 Hcy 및 Cys의 혈장 수준을 개선시키는 것으로 관찰되었고, Hcy의 혈장 수준은, 400MA PEG-htCBS C15S 투여 후 24시간부터 점차적으로 정상화되고 72시간째에 주사 전 수준으로 완전히 되돌아간 것과 비교하여 20NHS PEG-htCBS C15S 투여에는 후 최대 72시간까지 감소된 상태를 유지하였다. 유사한 패턴은 두 폐길화된 효소 모두에

대한 Cys의 혈장 수준에 의해 영향을 받았다.

- [0259] 증가된 투약은 CBS의 어떤 형태의 PD 프로파일이라도 유의적으로 개선시키지 않는 것으로 관찰되었고, 이는 효소의 최대 효능이 오로지 이의 혈장 수준 농도에 의해서만 좌우되는 것이 아니라 효소 동력학, 기질 이용률 및 농도와 같은 인자들에 의해서도 영향을 받는다는 것을 시사한다.
- [0260] 20NHS PEG-htCBS C15S는 400MA PEG-htCBS C15S와 비교하여 SC 투여 후에 가장 유리한 프로파일을 제공하는 것으로 관찰되었다. 구체적으로, 순환 반감기는 400MA PEG-htCBS C15S의 경우 39시간인 것과 비교하여 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우 47시간(즉, 20% 더 긴 반감기)이었고, 동량(10 mg/kg)의 SC 투여 후의 생체이용률은 혼합물의 경우 55.2%인 것과 비교하여 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우 64.6%(즉, 17% 더 우수한 생체이용률)이었다.
- [0261] *C. 20NHS PEG-htCBS C15S의 상이한 투여량들의 비교*
- [0262] PD 반응은 일반적으로 피크 혈장 수준에 정비례하여 발생하고 반감기와 비례하여 감소되는 것으로 관찰되었다. 그러나, 피크 반응에서의 투여량-관계는 5 mg/kg에서 최대 수준에 도달한 것으로 관찰되었고, 이로써 10 또는 15 mg/kg의 투여량은 도 10d에 도시된 바와 같이 호모시스테인 수준과 시스타티오닌 수준 둘 다로 측정된 바와 같은 피크 효능을 약간만 증가시켰다. 제거의 과형 패턴이 각 곡선에서 동일한 제거 단계 각각에서 관찰되었고, 이로써 혈장 활성은 48시간에 저점에 도달하고 이어서 72시간에 복구되었지만(또는 유사하였지만) 결국 96시간에 다시 저하되었다. htCBS C15S의 SC 투약 후에 관찰된 이러한 특이한 제거 패턴은 초기 빠른 흡수 단계 및 더 느린 후기 흡수 단계로 이루어진 2상성 흡수 단계의 청소 때문일 수 있다.
- [0263] 20NHS PEG-htCBS C15S의 투약 증가는 5 mg/kg과 비교하여 10 mg/kg의 투여량의 경우 대략 2배 더 높은 CBS 활성을 나타내는 것으로 관찰되었지만, 15 mg/kg의 보다 높은 투여량의 경우 직선형이 아니었으며 이는 도 10e에 도시되어 있다. 각 대사산물에 대해 10 투여량 그룹과 15 mg/kg 투여량 그룹의 PD 반응들 간의 식별가능한 차이가 있었다. 사실, 보다 고 투여량 그룹에서의 많은 시점들은 5 mg/kg 투여량 그룹의 반응을 하회하는 경향의 반응을 산출한 것으로 관찰되었다. 이러한 차이들은 20NHS PEG-htCBS C15S의 투여량이 증가할수록 관찰된 보다 낮은 생체이용률(단위 투여량당 감소된 흡수)에 의해 설명되지 않았다. 결론적으로, 5 mg/kg 내지 10 mg/kg의 단일 투여량은 HO 마우스 모델에서 최대 효능 반응을 산출하는 것으로 관찰되었다.
- [0264] **실시예 10. HO 마우스에서 장기간 투여 동안의 PEGC15S의 약력학**
- [0265] 본 실시예는 HO 마우스에서 장기간 외부에서 투여된, ME-200MAOB, ME-200GS, GL4-400MA, ME-400MA 또는 ME-050GS로 폐길화된 htCBS C15S의 약력학적 효능 및 잠재적 면역반응을 평가하고 비교한다. HO 마우스의 경우와 같이 인간 단백질이 마우스 계통 내로 조작되고 신생아 동물에서 발현될 경우, 면역반응은 인간 반응과 임상적 관련성이 있을 가능성이 더 크다. 문헌[참조: Guidance for Industry, Immunogenic assessment of therapeutic protein products, CEBR (August 2014)]을 참조한다. HO 마우스는 소량의 인간 CBS 단백질을 발현하고 PEG htCBS 효소에 대한 후천적 면역반응의 측면에서 완전한 녹아웃 또는 야생형 마우스보다 인간 환자와 더 유사할 가능성이 있다.
- [0266] 한 세트의 실험에서, ME-200MAOB, ME-200GS, GL4-400MA 또는 ME-400MA로 폐길화된 htCBS C15S를 평가하였다. 6개의 HO 마우스 그룹을 사용하여 이러한 연구들을 실시하였다: 두 그룹에게는 200MAOB PEG-htCBS C15S를 투여하였고(그룹 1 및 그룹 3) 한 그룹에는 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여하였고(그룹 4) 한 그룹에는 GL4-400MA PEG-htCBS C15S를 투여하였고(그룹 5) 두 그룹에는 400MA PEG-htCBS C15S를 투여하였다(그룹 6 및 그룹 7). 수컷 HO 마우스 및 암컷 HO 마우스 둘 다를 이러한 연구들에서 사용하였다(전체 n= 그룹당 6 내지 8마리 마우스).
- [0267] 그룹 1의 경우, 마우스에게 2차례의 200MAOB PEG-htCBS C15S의 5회의 매일 피하 주사를 1일째, 2일째, 3일째, 4일째 및 5일째(1주차) 및 15일째, 16일째, 17일째, 18일째 및 19일째(3주차)에 투여하였다. 본 실험을 위한 투여량은 5 mg/kg/일이었다. 식염수 대조 그룹(그룹 2)을 본 실험에 포함시켰다. 모든 나머지 그룹들에게는 5회의 매일 피하 주사를 1일째, 2일째, 3일째, 4일째 및 5일째(1주차); 15일째, 16일째, 17일째, 18일째 및 19일째(3주차); 및 29일째, 30일째, 31일째, 32일째 및 33일째(5주차)에 3차례 투여하였다. 본 실험들을 위한 투여량은 7.5 mg/kg/일이었다.
- [0268] 별도 세트의 실험에서, ME-200MAOB 또는 ME050GS로 폐길화된 htCBS C15S를 평가하였다. 수컷 및 암컷 HO 마우스(1M/5F)의 두 그룹에게 3차례의 200MAOB PEG-htCBS C15S(그룹 8) 또는 050GS PEG-htCBS(그룹 9)의 5회의 매일 피하 주사를 1일째, 2일째, 3일째, 4일째 및 5일째(1주차); 15일째, 16일째, 17일째, 18일째 및 19일째(3주차); 및 29일째, 30일째, 31일째, 32일째 및 33일째(5주차)에 투여하였다. 투여량은 7.5 mg/kg/일이었다.

- [0269] 모든 세트의 실험에서, 각각의 5일 투약 사이클 다음에 10일의 "세척 기간(washout period)"이 뒤따랐다. 혈액은 투약 주(1주차, 3주차 및 5주차)의 월요일, 수요일과 금요일 및 각 10일 세척 기간의 첫날(월요일)에 하악하란셋을 이용하여 샘플링하였다. 모든 혈액 샘플링 절차 및 피하 주사는 일중 변동으로 인한 아티팩트(artifact)를 회피하기 위해 오후 3시에 수행하였다. 혈액 샘플링과 주사 둘 다가 수행된 날에는 혈액 샘플링 절차를 최소 투여 전에 실시하였다.
- [0270] 각각의 폐길화된 htCBS C15S 접합체에 대한 HO 마우스의 약력학적 반응을, 기저선에서 및 처리 후에, 황전이 경로와 연관된 대사산물 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인의 혈장 수준을 정량함으로써 각 차례의 투약에 대해 평가하였다. 정량은 실시예 1에 기재된 바와 같은 안정적-동위원소-희석 액체 크로마토그래피 질량 분광법(LC/MS)에 의해 수행하였다. 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인의 최대 변화%를 각 투약 주 동안 기저선 값과 비교하여 계산하였다.
- [0271] *ME-200MAOB*: 3회의 독립적 연구를 200MAOB PEG-htCBS C15S(그룹 1, 3 및 8)로 수행하였다. 그룹 1에서, Hcy의 혈장 수준은 투약 1주차 동안 기저선 수준과 비교하여 68%까지 저하된 것으로 관찰되었지만, 그 중간에 10일 간의 세척 기간이 있는 3주차 동안 200MAOB PEG-htCBS C15S 주사의 제2 시리즈 동안 기저선 수준과 비교하여 단지 24%까지만 저하된 것으로 관찰되었다(표 12). 유사한 효능 감소는 두번째 라운드의 주사(표 13 및 표 14) 동안 Cth 수준 및 Cys 수준 둘 다의 약화된 상승에 의해 시사되었다. 약화된 효능이 상이한 세트의 나이브(naive) HO 마우스에서 관찰되었는지 여부를 결정하기 위해 제2 연구(그룹 3)를 실시하였다. 그룹 3에서의 총 Hcy 수준은 제1 주사 사이클 동안 기저선보다 82% 미만으로 감소된 것으로 관찰되었다. 3주차 및 5주차 동안의 제2 및 제3 주사 사이클 동안, Hcy 수준은 각각 기저선 값의 단지 57% 및 50%로 감소된 것으로 관찰되었다. 유사하게, 그룹 8에 투여된 200MAOB PEG-htCBS C15S의 추가 룯트는 투약 첫째주에는 기저선 수준과 비교하여 Hcy의 혈장 수준을 80%만큼 감소시켰지만, 투약 3주차 동안에는 기저선 값의 61%만큼만 감소시킨 것으로 관찰되었다. 투약 5주차 동안, Hcy의 혈장 수준은 기저선 값의 50%로 하락된 것으로 관찰되었다(표 12). 유사한 효능 감소는 1주차와 비교해 3주차 및 5주차 주사 동안 Cys 수준의 약화된 상승에 의해 시사되었다(표 13 및 표 14). 약화된 반응의 크기가 그룹 3 및 그룹 8과 비교해 그룹 1에서 보다 극적인 것으로 관찰되었지만, 약화된 효능의 유사한 경향이 그룹 1, 3 및 8에서 관찰되었다.
- [0272] *ME-200GS*: 실험 그룹 4에서의 20NHS PEG-htCBS C15S 투여는 Hcy의 혈장 수준을 투약 첫째주에서는 기저선 수준과 비교해 77%만큼 감소시켰고 투약 셋째주 동안에는 70%만큼 감소시키고 투약 다섯째주 동안에는 66%만큼 감소시킨 것으로 관찰되었다(표 12). 유사한 효능 감소는 투약 1주차와 비교해, 투약 3주차 및 5주차(표 13 및 표 14) 동안의 Cth 수준 및 Cys 수준의 약화된 상승에 의해 나타났다. 그러나, 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우, 투약 3주차 및 5주차에 관찰된 효능 감소는 다른 PEG htCBS C15S 접합체들에 비해서 가장 덜하였고 통계학적으로 무의미하였다.
- [0273] *GL4-400MA*: 그룹 5에서의 GL4-400MA-htCBS C15S 투여는 투약 첫째주에서는 기저선 수준과 비교해 Hcy의 혈장 수준의 평균 75% 감소를 야기하였지만, 투약 3주차 동안에는 단지 41%만 감소시켰고 투약 5주차 동안에는 34% 감소시켰다(표 12). 유사한 효능 감소는 1주차와 비교해, 투약 3주차 및 5주차(표 13 및 표 14) 동안의 Cth 수준 및 Cys 수준의 약화된 상승에 의해 나타났다.
- [0274] *ME-400MA*: 2회의 독립적 실험을 400MA PEG-htCBS C15S로 실시하였다(그룹 6 및 그룹 7). 그룹 6에서, Hcy 수준의 감소%는 1주차에서 기저선 수준과 비교해 73%인 것으로 관찰되었고 후속적으로 각각 투약 3주차 및 5주차 동안 65% 및 59%로 감소되었다. 효능 감소 정도는 3차례의 투약 동안 Hcy 수준의 약화된 감소로 나타난 바와 같이 그룹 7에서 보다 극적이었다(표 12). 약화된 효능의 유사한 경향은 그룹 6 및 그룹 7에 대한 Cth 수준 및 Cys 수준의 변화에서 관찰되었다(표 13 및 표 14).
- [0275] *ME-050GS*: 그룹 9에서의 050GS PEG-htCBS C15S 투여는 투약 1주차에서는 기저선 수준과 비교해 Hcy의 혈장 수준을 75%만큼 감소시켰지만, 투약 3주차 동안에는 기저선의 단지 59%만큼만 감소시켰다. 투약 5주차 동안에는, Hcy의 혈장 수준은 기저 수준의 42%로 감소된 것으로 관찰되었다(표 12). 유사한 효능 감소는 1주차와 비교해, 투약 3주차 및 5주차(표 13 및 표 14) 동안 Cth 수준 및 Cys 수준의 약화된 상승에 의해 나타났다.
- [0276] 표 12, 표 13 및 표 14는 상이한 형태의 폐길화된 htCBS C15S의 각 차례의 피하 주사 후에 혈장 호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인 대사산물 수준의 변화%를 제시한다. 상기 표들에서, 기저선 값은 평균±평균의 표준 오차(SEM)( $\mu$ M 단위)로서 제시되어 있으며, 변화는 각각의 5일 투약 사이클(1주차, 3주차 및 5주차) 동안의 기저선으로부터의 최대 변화%의 평균으로서 제시되어 있다. n.d.는 "측정되지 않음"을 나타낸다. 표 12는 PEGC15S

로 장기간 처리한 후 총 호모시스테인의 변화%를 제공한다.

표 12

HO 마우스에서 PEGC15S 처리 후 총 Hcy 수준의 변화

연구		기저선 (μM)	저점에서의 감소%		
그룹	PEG 모이어티	0 일	1 주차	3 주차	5 주차
1	ME-200MA0B	155.3±15.7	68%	24%	n.d.
2	염수	176.1±20.9	-8%	-8%	n.d.
3	ME-200MA0B	239.9±26.2	82%	57%	50%
4	ME-200GS	164.4±15.9	77%	70%	66%
5	GL4-400MA	169.7±14.4	75%	41%	34%
6	ME-400MA	134.0±22.2	73%	65%	59%
7	ME-400MA	239.1±11.4	75%	52%	42%
8	ME-200MA0B	224.0±14.0	80%	61%	50%
9	ME-050GS	192.1±17.1	75%	59%	42%

[0277]

[0278] 표 13은 PEGC15S로 장기간 처리한 후 시스타티오닌의 변화%를 제공한다.

표 13

HO 마우스에서 PEGC15S 처리 후 시스타티오닌 수준의 변화

연구		기저선 (μM)	피크에서의 증가%		
그룹	PEG 모이어티	0 일	1 주차	3 주차	5 주차
1	ME-200MA0B	4.1±0.2	796%	508%	n.d.
2	염수	4.5±0.4	-1%	-19%	n.d.
3	ME-200MA0B	4.8±0.4	700%	866%	335%
4	ME-200GS	5.0±0.6	676%	492%	432%
5	GL4-400MA	3.2±0.3	715%	723%	449%
6	ME-400MA	5.0±0.5	383%	329%	365%
7	ME-400MA	4.1±0.4	696%	649%	443%
8	ME-200MA0B	3.6±0.4	1023%	764%	1100%
9	ME-050GS	4.0±0.5	978%	795%	833%

[0279]

[0280] 표 14는 PEGC15S로 장기간 처리한 후 시스테인의 변화%를 제공한다.



표 14

HO 마우스에서 PEGC15S 처리 후 시스테인 수준의 변화

연구		기저선 (μM)	피크에서의 증가%		
그룹	PEG 모이어티	0 일	1 주	3 주	5 주
1	ME-200MA0B	170.7±8.5	36%	16%	n.d.
2	염수	166.2±8.7	-18%	5%	n.d.
3	ME-200MA0B	149.5±7.0	72%	38%	32%
4	ME-200GS	147.3±10.0	59%	61%	51%
5	GL4-400MA	114.5±8.6	98%	48%	52%
6	ME-400MA	184.3±16.1	17%	6%	8%
7	ME-400MA	122.8±4.5	72%	44%	44%
8	ME-200MA0B	123.8±7	77%	77%	58%
9	ME-050GS	128.5±11.9	71%	75%	36%

[0281]

[0282]

이들 연구의 결과는 모든 그룹들에서 혈장 Cth 및 Cys의 증가와 더불어 혈장 Hcy 수준의 감소를 나타내며, PEG-C15S 처리에 대한 반응으로서 대사산물의 정상화를 시사한다. 모든 그룹들에서, 최대 효능은 투약 첫째주 동안에 관찰되었다. Hcy 수준은 표 12에 제시된 바와 같이 모든 실험 그룹들에 대해 기저선 미만으로 유의적으로(약 68% 내지 약 82%) 감소되는 것으로 관찰되었다. Cth 및 Cys 수준의 피크 증가%도 또한 표 13 및 표 14에 제시된 바와 같이 1주차 동안 최대였다. 약력학적 반응의 크기는 3주차 동안의 PEG-C15S 주사의 후속적 사이클 동안 감소하였고 5주차에 추가로 감소하였다. 종합하면, 가장 높고 가장 오래 지속되는 약력학적 반응은 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우에 관찰되었다.

[0283]

약화된 효능은 20NHS PEG-htCBS C15S를 제외한 모든 연구된 접합체들에 대해 투약 3주차 동안에 투여된 폐길화된 htCBS C15S 투약의 두번째 차례 동안 관찰되었다. 효능의 추가 감소는 3주차와 비교해 5주차 동안 수행된 세번째 투약 사이클 동안에 관찰되었다. 항체 형성이 이들 연구에서 직접 측정되지 않았지만, 반복 투여 후 이러한 느린 효능 감소는 후천적 면역을 나타내는 전형적인 징후이다. 따라서, 약화에 대한 가능성 있는 설명은 ME-200MA0B, MA-400ME, GL4-400MA 또는 ME-050GS로 폐길화된 htCBS C15S로 지시된 면역 반응이었다.

[0284]

시험된 접합체들 중에서, 20NHS PEG-htCBS C15S는 가장 강력하고 오래 지속되는 효능을 갖는 것으로 관찰되었다. ME-200GS는 다른 PEG들과 비교하여 htCBS C15S상의 면역원성 에피토프를 보다 효율적으로 차폐할 수 있다는 가설이 세워진다. 따라서, 20NHS PEG-htCBS C15S 형태는 시험된 다양한 폐길화된 htCBS C15S 접합체의 가장 강력하고 면역원성이 가장 적은 형태인 것으로 관찰되었다.

[0285]

**실시예 11. ME-200MA0B, ME-400MA 또는 ME-200GS로 폐길화된 htCBS C15S는 조기 사망으로부터 KO 마우스를 구제한다**

[0286]

다양한 폐길화된 htCBS C15S 접합체들의 효능을 비교하기 위해 생존 연구를 본원에 기재된 KO 마우스 모델에서 수행하였다.

[0287]

A. 21일/35일째까지의 KO 새끼 마우스의 생존

[0288]

ME-200MA0B(n=24), ME-400MA(n=31=13마리 암컷 + 18마리 수컷) 또는 ME-200GS(n=28=14마리 암컷 +14마리 수컷)로 폐길화된 7.5 mg/kg htCBS C15S를 주 3회 주사한 KO 마우스 및 대조 그룹으로서 PBS를 주사한 KO 마우스(n=44) 그룹의 카를란 메이어 생존 곡선을 플롯팅하였다. 수유부 마우스는 베타인 물로 유지시키고, 이유식 후 새끼 마우스(21일째)에게는 베타인을 함유하지 않는 일반적 물을 공급하였다. 주사된 효소가 KO 새끼 마우스를 구제하는 능력을 시험하였다.

[0289]

도 11a에 도시된 바와 같이, 21일째에, 200MA0B PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200MA)가 주사된 마우스의 약 92% 및 400MA PEG-htCBS C15(C15S/400MA) 또는 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/200GS)가 주사된 마우스의 약 97%가 생존한 것과 대조적으로 PBS-주사된 그룹에서 마우스의 오직 약 20%만이 생존하였다.

[0290]

B. 주말 세척기 후(저점) 및 마지막 주사한지 24시간 후(피크)의 대사산물 수준

- [0291] 4주령 내지 5주령의 생존 KO 마우스에서의 대사산물 수준을 주말 세척 후(저점) 및 마지막 주사한지 24시간 후(피크)에 실시예 1의 실험 절차를 사용하여 측정하였다.
- [0292] 측정된 수준을 도 11b에 도시된 바와 같이 유사하게 처리된 건강한 KO +/- 동복자에서의 수준과 비교하였다. 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 Hcy의 혈장 수준은 투약 후 72시간째에  $256 \pm 8 \mu\text{M}$ (ME-400MA)(각 대사산물에 대해 가장 좌측의 막대) 내지 투약 후 24시간째에  $145 \pm 6 \mu\text{M}$ (ME-400MA 24h)(각 대사산물에 대해 좌측에서 두번째 막대)의 범위였다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 Hcy의 혈장 수준은 투약 후 72시간째에  $179 \pm 10 \mu\text{M}$ (ME-200GS)(좌측에서 세번째 막대) 내지 투약 후 24시간째에  $96 \pm 8 \mu\text{M}$ (ME-200GS 24h)(좌측에서 네번째 막대)의 범위였다. 따라서, 두 htCBS C15S 접합체 모두에 대한 최대 반응은 투약 후 24시간째에 관찰되었고 투약 후 72시간째에 감소되는 것으로 관찰되었다. 어떤 접합체의 처리라도 독성 Hcy의 혈장 수준을 약 절반까지 유의적으로( $p < 0.001$ ) 감소시키는 것으로 관찰되었다. 반대로, 처리된 건강한 이형접합 동복자의 호모시스테인의 혈장 수준은 두 시점 모두에서 약  $5 \mu\text{M}$ 인 것으로 관찰되었다.
- [0293] Cth 수준은 폐결화된 htCBS C15S 접합체로 처리된 KO 마우스에서 57 내지  $77 \mu\text{M}$ 의 범위 내에 있는 것으로 관찰되었다. 이들 혈장 수준은 미처리된 이형접합 마우스에서 관찰된 혈장 수준보다 대략 12배 더 높았다. Cth의 피크 혈장 수준과 저점 혈장 수준 간의 차이는 작은 것으로 관찰되었으며, 이것은 시스타티오닌 수준에 미치는 효소의 약력학적 효과가 72시간 이상 유지될 수 있고/있거나 Cth가 더 큰 차이가 관찰된 다른 대사산물에 비해 혈장으로부터 더 천천히 청소될 수 있다는 증거이다. 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스 둘 다에서 투약 후 72시간째의 Cys의 혈장 수준은 건강한 이형접합 동복자( $151 \pm 6$ )와 비교해 각각  $83 \pm 4$  및  $106 \pm 6 \mu\text{M}$ 로 유의적으로 감소되는 것으로 관찰되었다( $p < 0.001$ ). Cys의 혈장 수준은 처리된 KO 마우스에서 두 접합체 모두에 대해 투약 후 24시간째에 증가된 것으로 관찰되었으며, 이는 순환 항 대사산물의 부분적 정상화를 나타낸다. Cys의 혈장 수준은 400MA PEG-htCBS C15S가 투여된 후 24시간째에  $157 \pm 6$ 로 증가되고 20NHS PEG-htCBS C15S 투여된 후 24시간째에  $176 \pm 6 \mu\text{M}$ 로 증가되는 것으로 관찰되었다. 메티오닌 혈장 수준은 건강한 이형접합 대조 그룹에 비해서 KO 마우스에서 다소 상승되었고 저점 수준과 피크 수준 사이에서 유의적으로 변하지 않았다.
- [0294] C. 초기 또는 연속적 처리 후의 수명
- [0295] KO 마우스의 신생아 치사를 예방하기 위한 초기 35일(5주) 장기 투여 후, 20NHS PEG-htCBS C15S로 처리된 KO 마우스를 두 그룹으로 나누었다. 한 그룹(5W)은 초기 처리 외에는 어떠한 처리를 받는 것도 중단하였고, 반면에 다른 그룹(CONT)은 120일령까지 동일한 용법을 지속하였다( $7.5 \text{ mg/kg}$ , SC,  $3 \times 1$ 주).
- [0296] 최대 4개월 동안 이들 KO 새끼 마우스의 그룹의 생존을 관찰하였고 도 11c에 플롯팅하였다. 지속적으로 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)가 투여된 모든 KO 마우스는 도 11c에 도시된 바와 같이 적어도 119일째에 생존하였다. 초기 35일 후 처리를 종료한 결과, 119일령에서 약 85%가 생존하였다.
- [0297] D. CBS-처리된 KO 마우스 대 +/- 건강한 마우스의 총 체중 및 체중 증가
- [0298] 20NHS PEG-htCBS C15S가  $7.5 \text{ mg/kg}$ 의 투여량으로 주 3회 투여된 KO 마우스(수컷  $n=16$  및 암컷  $n=11$ )의 총 체중 및 체중 증가량을 측정하고 유사하게 처리된 +/- 건강한 동복자(수컷  $n=14$  및 암컷  $n=13$ )와 비교하였다. 21일째부터 36일째까지 이유한 후 총 체중 및 체중 증가를 마우스에서 측정하였다.
- [0299] 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 수컷 마우스가 21일째에 최고 체중(약  $10\text{g}$ )을 갖는다 해도, 이형접합 수컷 마우스는 23일째부터 35일째까지 약  $10.5\text{g}$  내지 약  $18\text{g}$  범위의 가장 큰 총 체중을 갖는 것으로 관찰되었다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 암컷 마우스는 23일째 후에는 약  $10\text{g}$  내지 약  $14\text{g}$  범위의 최저 체중을 가졌다.
- [0300] 건강한 수컷 마우스( $n=14$ )는 또한 23일째부터 시작하여 약  $2 \text{ g}$  내지 약  $9.5 \text{ g}$ 의 범위로 체중 증가량이 가장 컸다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 수컷 마우스( $n=16$ ) 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 암컷 마우스( $n=11$ )의 체중 증가량은 두 대조 그룹 모두의 체중 증가량보다 유의적으로 더 낮았다.
- [0301] **실시예 12. 폐결화된 htCBS C15S는 I278T 마우스 모델에서 안면 탈모증을 지연, 예방 및 역전시킨다**
- [0302] 호모시스틴뇨증의 I278T +/- 동형접합 마우스 모델은 다른 호모시스틴뇨증 마우스 모델과 달리, 전형적인 대사산물의 프로파일 외에 안면 탈모증과 같은 특이적 표현형 형질을 나타내는 것으로 관찰되었다. 안면 탈모증은 안면 및 두부의 탈모로서 정의된다. 안면 탈모증의 개시는 약 90일령(W12)이며, 전형적으로 약 120일령(W17)에 완전히 발달하였다.
- [0303] 안면 탈모증은 호모시스틴뇨증 및 관련 대사 프로파일과 관련되고; 따라서, 효소 대체 요법(ERT; PEG-CBS)의 실

시는 진행을 늦추고/거나 개시를 예방/지연시키고/시키거나 이미 발생한 손상을 역전시킴으로써 이러한 표현형을 구제한다고 가설을 세운다.

[0304] A. 안면 탈모증의 개시의 지연

[0305] 어떠한 안면 탈모증 징후도 나타내지 않는 3주령 마우스를 2개의 그룹으로 나누었다. 첫번째 그룹(n = 3마리 수컷)에게 6주의 기간 동안 200MAOB PEG-htCBS C15S를 7.5 mg/kg으로 주당 3회 주사하였다. 신체적 외모를 실험 전에 기록하고 매주 모니터링하고 이어서 6주 주사 용법 후에 격주로 모니터링하였다. 대사산물 수준을 실험 전 및 마지막 주사한지 24시간 후, 즉 6주 주사 용법 후에 확인하였다.

[0306] 도 12a에서 3주령부터 6주의 기간 동안의 200MAOB PEG-htCBS C15S 투여는 안면 탈모증의 개시를 지연시키는 것으로 관찰되었다. I278T 이환된(-/-) 또는 건강한(+/-) 마우스는 그 연령에서 구별하기 어려운 것으로 관찰되었고, -/- 마우스는 안면 탈모의 징후가 없었다. 미처리된 I278T +/- 건강한 이형접합 마우스는 38주까지 안면 탈모증이 완전히 발달한 것으로 관찰된 미처리된 I278T -/- 이환된 동형접합 마우스와 달리 19주째에 안면 모발의 손실을 앓지 않았고 34주째에 오직 경미한 탈모만을 앓은 것으로 관찰되었다. 전형적으로, 안면 탈모증은 12주째에 명백해졌으며 17주령까지 완전히 발달하였다.

[0307] 6주 동안의 200MAOB PEG-htCBS C15S 투여(주사 동안 마우스의 연령은 4주령 내지 10주령이었다)는 4개월령에 안면 탈모의 징후를 나타내지 않고 7개월령에 오직 초기 징후만을 나타낸 것으로 관찰된 I278T -/- 이환된 동형접합 마우스로 입증되는 바와 같이 처리 기간(6주)과 거의 동일한 시간 동안 탈모증의 개시를 지연시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과들은 6주 동안의 200MAOB PEG-htCBS C15S 투여가 I278T 마우스에서 안면 탈모증의 개시를 지연시켰다는 증거를 제공한다.

[0308] B. 안면 탈모증의 발달의 완전한 예방

[0309] 두번째 그룹(n = 3; 2마리 수컷, 1마리 암컷)에게 3주령부터 41주령까지 7.5 mg/kg의 200MAOB PEG-htCBS C15S를 연속적으로 피하 주사하였다. 체중을 초기에는 매주 모니터링하였다. 신체적 외모를 실험 전에 기록하고 초기 6주 주사 용법 후에 매주 또는 격주로 모니터링하였다. 대사산물 수준을 실험 전 및 초기 6주 주사 용법의 마지막 주사 24시간 후에 확인하고 이어서 매주 또는 격주로 확인하였다.

[0310] I278T -/- 동형접합 마우스에게 200MAOB PEG-htCBS C15S를 연속 투여하는 것은 도 12b에 도시된 바와 같이 19주령, 24주령, 31주령 및 35주령에서 관찰된 마우스의 안면 탈모증의 개시 및 발달을 완전히 예방하는 것으로 관찰되었다. 이렇게 처리된 마우스의 신체적 외모는 건강한 I278T +/- 이형접합 마우스에서 전형적으로 관찰된 신체적 외모와 유사하며 미처리된 I278T -/- 대조 그룹 및 단지 6주 기간 동안만 처리된 36주령 이상의 I278T -/- 동형접합 마우스 둘 다의 신체적 외모와 유의적으로 상이하다.

[0311] 도 12c의 대사산물 측정은 200MAOB PEG-htCBS C15S의 연속적 투여가 처리 전의 Hcy 수준(약 300  $\mu$ M)과 비교해 Hcy 수준을 유의적으로 감소시켰고 약 100  $\mu$ M의 총 Hcy(중간선)의 수준에서 안정화시켰음을 보여준다. Cys 수준(최상단 선)은 처리(약 130  $\mu$ M 내지 약 240  $\mu$ M)로 정상화되었고 대략 230  $\mu$ M의 수준에서 전체적으로 유지되었다.

[0312] C. 일단 안면 탈모증이 완전히 발달했을 때의 표현형의 역전/정상화

[0313] 적어도 120일(17주)령이고 육안으로 보기에 완전히 발달한 안면 탈모증을 갖는 I278T 마우스를 두 그룹으로 나누었다. 그룹 A(n=6; 3마리 수컷 및 3마리 암컷)에게 400MA PEG-htCBS C15S를 주당 3회 주사하고, 그룹 B(n=4; 2마리 수컷 및 2마리 암컷)에게 약 1년령이 될 때까지 20NHS PEG-htCBS C15S를 주당 3회 주사하였다. 대사산물 수준을 처리 개시 전에 결정하고 주사한지 24시간 후에 연구 동안 측정하고, 체중 및 신체적 외모를 초기에는 매주 모니터링하고 이후에는 격주로 모니터링하였다.

[0314] I278T -/- 동형접합 마우스에서의 안면 탈모증의 역전(달리 표현형의 정상화로서 공지됨)을 위해, 이미 안면 탈모증 표현형을 완전히 발현하는 마우스의 처리를 개시하였다. 연구 시작시에 동물의 연령은 탈모증의 개시에 대한 전형적 연령(120일 또는 17주)을 넘는 24주령 내지 28주령의 범위였다.

[0315] 주 3회로 PEG-CBS 접합체들 중 하나를 연속 투여하는 것은, 비록 미처리된 이환되지 않은 I278T +/- 이형접합 대조 그룹과 비교하여 안면 탈모증을 완전히 정상화시키지는 못하였지만, 도 12d에 도시된 바와 같이 안면 탈모증을 유의적으로 개선시켰다. 20NHS PEG-htCBS C15S로 처리된 모든 동물들이 처리에 반응하였고(4마리 중 4마리) 반면에 6마리의 동물 중 5마리만이 400MA PEG-htCBS C15S로 처리에 반응하였기 때문에, 20NHS PEG-htCBS C15S는 400MA PEG-htCBS C15S보다 성능이 우수한 것으로 관찰되었다. 또한, 상기 마우스들의 주관적 관찰

은 마우스 피모의 두께 및 광택이 20NHS PEG-htCBS C15S가 투여된 마우스의 경우 더 우수하다는 것을 제공한다.

[0316] 게다가, 도 12e의 대사산물 측정은, 2가지 PEG-CBS 분자 모두가 효과적이지만 20NHS PEG-htCBS C15S(그룹 B)가 400MA PEG-htCBS C15S(그룹 A)보다 더 상당히 Hcy 수준을 감소시키고 Cys 수준을 증가시키는 것으로 관찰되었음을 보여준다.

[0317] D. 결론

[0318] PEG-CBS 투여는, PEG 모이어티와 상관없이, 상기 언급한 바와 같이 미처리된 I278T  $-/-$  동형접합 마우스에서 전형적인 표현형 형질인 안면 탈모증을 개선시켰다. 6주 동안의 ERT 실시는 안면 탈모증의 개시를 지연시켰다. 안면 탈모증의 개시 전 마우스에게 연속적 ERT를 실시하는 것은 안면 탈모증의 발달을 완전히 예방하였고 이러한 동물은 미처리된 건강한 I278T  $+/-$  이형접합 마우스와 구별하기 어려웠다. 이미 안면 탈모증이 완전히 발달한 마우스에게 연속적 ERT를 실시하는 것은 마우스의 신체적 외모를 유의적으로 개선시켰다. 모든 사례에서, 안면 탈모증에 대한 긍정적 효과는 혈장 대사산물 수준의 적어도 부분적(Hcy) 또는 전체적(Cys) 정상화를 동반하거나 이에 의해 유발되었다.

[0319] **실시예 13. 20NHS PEG-htCBS C15S를 KO 마우스에서 간 질환을 개선시킨다**

[0320] 조직학적 분석을 2일령부터 7.5 mg/kg의 20NHS PEG-htCBS C15S 또는 PBS가 주 3회 피하 주사되고 17일령 내지 19일령에서 안락사된 KO 마우스로부터의 간 절편에 대해 수행하고, 연령-매치된  $+/-$  건강한 대조 마우스의 간과 비교하였다.

[0321] A. 광학 현미경

[0322] 동물을 17일 내지 19일째에 희생시키고 간 샘플을 광학 현미경에 의한 조직학적 분석용으로 가공하였다. PBS-주사된 KO 마우스의 간 실질은, 도 13a에 도시된 바와 같이 화살표로 표시되어 있는 중등도 내지 중증 지방증, 국소 간세포 괴사 및 흡수성 염증반응을 갖는 간엽의 다소 불규칙한 구조를 갖는 것으로 관찰되었다. 도 13a에 또한 도시된 건강한 이형접합 마우스 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 간 실질은 규칙적 간 구조 및 최소의 핵부동을 갖는 것으로 관찰되었다.

[0323] 도 13a에 도시된 동일한 간 절편의 고 배율에 의해 제공된 더욱 상세한 도면은 지질에 대한 오일 레드 O 염색을 도시하는 삽도가 있는 도 13b에 도시되어 있다. PBS-주사된 KO 마우스는 미세혈관 및 거대혈관 지방증, 핵부동, 간세포의 국소 괴사 및 흡수성 염증 반응을 갖는 것으로 관찰되었다. 이러한 특징들은 화살표로 표시되어 있다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 간 실질은, 둘 다 규칙적인 크기와 모양을 가지며 미세한 염색질 및 눈에 띄지 않는 핵소체를 갖는 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 핵 및 건강한 이형접합 마우스의 핵으로 입증되는 바와 같이, 최소의 핵부동을 갖는 것으로 관찰되었다. 처리된 마우스 및 건강한 마우스의 간세포의 세포질내에서 보여진 별개의 지질 소립들은 오일 레드 O 염색을 사용하여 검출하였다(도 13b의 삽도를 참조).

[0324] B. 전자 현미경

[0325] 3000 $\times$  배율에서 전자 현미경을 사용하여 건강한 이형접합( $+/-$ ) 마우스, PBS-처리된 KO 마우스 및 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스로부터의 간 조직을 또한 관찰하였다. 포착된 전자 현미경 영상들은 도 14a에 도시되어 있다. 도 14a에서, 검은색 화살표는 조면 소포체(ER)를 나타내고 흰색 화살표는 미토콘드리아(MT)를 나타낸다. 검은색 별표(\*)는 세포질 글리코젠을 나타내고 이중 검은색 별표(\*\*)는 핵을 나타낸다. 흰색 별표는 지질 소립을 나타낸다.

[0326]  $+/-$  마우스는 정상 세포질 조성과 정상 형태의 핵을 갖는 이핵 간세포를 갖는 것으로 관찰되었다. 조면 소포체의 시스터나는 얇고 규칙적으로 조직화되어 있는 것으로 관찰되었으며, MT는 정상적인 크기와 모양을 갖는 것으로 관찰되었다. 핵은 규칙적이고 비색소성이며 눈에 띄지 않는 핵소체를 갖는 것으로 관찰되었다.

[0327] PBS-처리된 KO 마우스는 지방증, 증가된 수의 세포질 소기관 및 간세포의 불규칙한 과염색성 핵을 갖는 것으로 관찰되었다. 세포질은 소기관이 풍부하고 수많은 지질 소립(흰색 별표) 및 부종성 MT를 함유하는 것으로 관찰되었다. 핵은 조악한 염색질, 불규칙적 윤곽 및 두드러진 핵소체를 갖는 것으로 관찰되었다.

[0328] 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 마우스는 간세포 내의 정상적 세포질 조성 및 일정한 정상색소성 핵을 갖는 것으로 관찰되었다.  $+/-$  마우스와 마찬가지로, ER의 시스터나는 얇고 규칙적으로 조직화되어 있는 것으로 관찰되었으며, MT는 정상적인 크기와 모양을 가졌고 핵은 미세한 염색질을 가지며 정상으로 보였다.

[0329] 8000 $\times$  배율의 전자 현미경 영상은 도 14b에 도시된 바와 같이 이러한 조사 결과들을 더욱 상세히 확인시켜 준



다. 도 14b에서, 검은색 화살표는 소포체(ER)를 나타내고 흰색 화살표는 미토콘드리아(MT)를 나타낸다. 검은색 별표(\*)는 세포질 글리코젠을 나타낸다. 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 마우스 및 +/- 마우스는 얇고 정상적으로 조직화된 조면 소포체 시스터나 및 규칙적 MT를 갖는 것으로 관찰되었다. PBS-처리된 KO 마우스는 시스터나 및 소포낭에서 풍부한 것으로 관찰되었다. ER 시스터나는 가변적으로 증가하는 너비를 갖는 것으로 관찰되었다. MT는 다형성이고 비조직적 시스터나를 가지며 팽윤되어 있는 것으로 관찰되었다.

[0330] C. 18일 내지 19일령의 KO 마우스에서 혈장 및 조직 중의 대사산물 수준의 비교

[0331] 혈장 및 조직 대사산물을 야생형 마우스 그룹(대조그룹), 미처리된 동형접합 +/- 치환된 KO 마우스 그룹 및 400MA PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스의 그룹에서 측정하였다. 처리 그룹에게 2일령부터 7.5 mg/kg의 투여량으로 주당 3회 400MA PEG-htCBS C15S의 3회 피하 주사를 투여하였다. 혈장 및 조직을 마지막 주사한지 24시간 후에 수거하였다. 표 15는 혈장 중 Hcy, Cys, Cth 및 Met의 수준을 나타낸다.

표 15

혈장 중 대사산물 수준 [ $\mu\text{M} \pm \text{SEM}$ ]

유전형	처리	호모시스테인	시스타티오닌	시스테인	메티오닌
야생형	없음	10.1±0.7	2.8±0.1	237.9±9.2	87.7±5.6
KO <sup>+/-</sup>	없음	11.7±0.7	1.7±0.1	236.8±2.7	93.4±12.6
KO	없음*	261.4±12.9	0.06±0.02	95.9±8.1	483.7±51.7
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	52.8±6.8	133.2±9.1	211.7±11.5	99.2±5.4
* 대 **, p-값		0.0001	0.001	0.0001	0.0018

[0332]

[0333] 표 16은 간 조직 중 Hcy, Cys, Cth 및 Met의 수준을 나타낸다.

표 16

간 조직 중 대사산물 수준 [ $\text{nmols/g} \pm \text{SEM}$ ]

유전형	처리	호모시스테인	시스타티오닌	시스테인	메티오닌
야생형	없음	9.2±0.4	24.9±7.8	257.8±13.7	39.2±2.1
KO <sup>+/-</sup>	없음	8.9±5.2	28.5±19.3	326.7±147.9	26.9±9.8
KO	없음*	63.4±8.6	0.48±0.1	110.6±13.0	511.0±66.8
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	22.4±3.4	18.9±1.8	205.2±27.4	25.5±3.4
* 대 **, p-값		0.01	0.0005	0.0355	0.0019

[0334]

[0335] 표 17은 신장 조직 중 Hcy, Cys, Cth 및 Met의 수준을 나타낸다.

표 17

신장 조직 중 대사산물 수준 [ $\text{nmols/g} \pm \text{SEM}$ ]

	처리	호모시스테인	시스타티오닌	시스테인	메티오닌
	없음	5.58±0.18	6.67±1.01	225.6±10.8	61.2±13.2
	없음	0.92±0.04	5.38±2.10	370.8±102.6	65.9±6.2
	없음*	30.6±7.1	0.47±0.06	239.8±34.5	466.2±112.8
	20NHS PEG-htCBS C15S**	6.76±4.42	256.0±77.5	282.8±17.1	53.3±2.9
		0.0460	0.0300	0.3285	0.0216

[0336]



[0337] 표 18은 뇌 조직 중 Hcy, Cys, Cth 및 Met의 수준을 나타낸다.

표 18

뇌 조직 중 대사산물 수준 [nmols/g  $\pm$  SEM]

유전형	처리	호모시스테인	시스타티오닌	시스테인	메티오닌
야생형	없음	4.0 $\pm$ 0.9	69.0 $\pm$ 18.3	55.0 $\pm$ 3.6	61.6 $\pm$ 1.4
KO <sup>+/-</sup>	없음	0.17 $\pm$ 0.02	34.3 $\pm$ 5.0	54.3 $\pm$ 1.5	56.6 $\pm$ 11.2
KO	없음*	24.8 $\pm$ 7.5	1.3 $\pm$ 0.3	51.4 $\pm$ 1.4	616.0 $\pm$ 71.1
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	1.1 $\pm$ 0.1	8.5 $\pm$ 1.1	56.8 $\pm$ 3.0	68.6 $\pm$ 4.7
* 대 **, p 값		0.0388	0.0027	0.1760	0.0015

[0338]

[0339] 실시예 14. HO 마우스에서 ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프를 사용한 20NHS PEG-htCBS C15S의 연속적 투여의 효과

[0340] ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프는 새로운 나이브 HO 마우스에서 연장된 기간 동안의 20NHS PEG-htCBS C15S의 일정한 제어된 전달을 제공한다. ME-200GS로 폐기화된 htCBS C15S를 반복된 피하 주사 대신에 시간당 일정 용적의 효소를 연속적으로 분배하는 미세삼투 ALZET<sup>®</sup> 펌프의 4가지 상이한 모델을 사용하여 투여하였다: 모델 1002(0.25  $\mu$ l/h), 모델 2002(0.5  $\mu$ l/h), 모델 2004(0.25  $\mu$ l/h) 및 모델 2006(0.15  $\mu$ l/h).

[0341] 통증 완화를 위해, 수술전 및 수술후에, 동물들에게 또한 물병 내의 TYLENOL<sup>®</sup> (2 mg/ml)을 ALZET<sup>®</sup> 펌프를 이식하기 위한 외과술 전과 후에 48시간 동안 자유롭게 투여하였다. 또한, 동물들에게 수술 후 48시간 동안 매 24시간마다 5 mg/kg의 카프로펜을 피하 투여하였다. 외과술 동안의 마취를 위해, 5% 이소플루란을 흡입에 의해 투여하고 외과술 동안 2 내지 3%에서 유지시켰다. 마우스들이 마취된 동안, 마우스들을 각각 생물 안전 캐비닛 내에서 멸균 조건하에 의료 등급 ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프를 이식하였다. 펌프는 목의 앞쪽면의 느슨한 피부 영역에 피하 이식하였다. 펌프를 이식하기 전에, 마우스를 면도하고 피부 영역을 BETADINE<sup>®</sup>으로 준비시켰다. 펌프 이식은 멸균 가위를 사용하여 작은 외과술 절개부(5 mm)를 만드는 것을 필요로 하였다. 상기 절개부를 상처 클립(wound clip)으로 봉합하고, 1주 후에 피부가 완전히 치유되었을 때 상처 클립을 제거하였다. 혈액 샘플은 펌프 모델 1002 및 2002의 경우 1, 3, 6, 9, 12, 15, 19 및 20일에 수집하였다. 모델 2004 및 2006의 펌프를 펌프의 디자인된 라이프 사이클(모델 2004 및 모델 2006의 경우 각각 4주 및 6주)의 말기에 외과술에 의해 제거하였다. 따라서, 혈액 샘플의 수집을 각 펌프에 맞게 조정하였다: 연구 30일째에 외식된 모델 2004의 경우 1, 3, 5, 12, 19, 26, 31, 32, 33 및 36일 및 연구 44일째에 외식된 모델 2006의 경우 1, 3, 5, 12, 19, 26, 33, 40, 45, 46, 47 및 50일. 혈장 샘플은 혈장 중 CBS 활성을 결정하고 Hcy, Cth 및 Cys 수준을 측정하기 위해 사용하였다.

[0342] 모델 1002 및 2002로 투여되는 효소는 673.9 $\pm$ 13.2 U/mg의 비활성을 갖는 21 $\mu$ g/ $\mu$ l의 농도의 20NHS PEG-htCBS C15S였다. 본 실험들에서, 모델 1002는 14일의 기간 동안 평균 양수율이 0.25 $\pm$ 0.01  $\mu$ l/hr이었고 평균 충전 용적은 110.7 $\pm$ 6.5  $\mu$ l였다. 효소의 투여 속도는 효소 5.25  $\mu$ g/hr였고, 이는 126  $\mu$ g/일 또는 85 U/일과 동일한 약 3.5 U/hr에 상당한다.

[0343] 모델 2002는 14일의 기간 동안 평균 양수율이 0.48 $\pm$ 0.02 $\mu$ l/hr이었고 평균 충전 용적은 207 $\pm$ 7 $\mu$ l였다. 투여 속도는 효소 0.5 $\mu$ g/hr였고, 이는 252  $\mu$ g/일 또는 168 U/일과 동일한 약 7 U/hr에 상당한다.

[0344] 도 15a는 모델 1002 또는 모델 2002 ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프가 이식된 HO 마우스들 간에 Hcy 및 Cys의 혈장 수준을 비교하는 그래프이다. 두 그룹들의 혈장 중 대사산물 수준의 겹침이 관찰되었다. 도 15b는 모델 1002 또는 모델 2002 ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프를 이용하여 연속적 투여한 후의 혈장 중 20NHS PEG-htCBS C15S의 비활성을 비교하는 그래프이다. 모델 2002 펌프가 이식된 HO 마우스의 혈장 중 CBS 활성은 모델 1002가 이식된 마우스와 비교하여 대략 2배인 것으로 관찰되었다. 그러나, 모델 2002 펌프가 이식된 마우스의 혈장 중 CBS 활성의 2배인 것은 모델 1002 펌프가 이식되었고 모델 2002 펌프와 비교해 대략 절반의 혈장 CBS 활성을 갖는 마우스에서 달성된 바와 같은 유사한 혈장 대사산물의 개선을 야기하였다.

[0345] 모델 2004 및 2006로 투여된 효소는 623.2 $\pm$ 16.4 U/mg의 비활성을 갖는 18 $\mu$ g/ $\mu$ l의 농도의 ME-200GS 폐기화된

htCBS C15S였다. 모델 2004는 28일의 기간 동안 평균 양수율이  $0.23 \pm 0.01 \mu\text{l/hr}$ 이었고 평균 충전 용적은  $237.7 \pm 4.6 \mu\text{l}$ 였다. 효소의 투여 속도는 효소  $4.5 \mu\text{g/hr}$ 였고, 이는  $108 \mu\text{g/일}$  또는  $67 \text{ U/일}$ 과 동일한 약  $2.8 \text{ U/hr}$ 에 상당한다. ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프 모델 2004는 30일에 외식된다.

[0346] 모델 2006은 42일의 기간 동안 평균 양수율이  $0.15 \pm 0.01 \mu\text{l/hr}$ 이었고 평균 충전 용적은  $237 \pm 3.0 \mu\text{l}$ 였다. 효소의 투여 속도는 효소의  $2.7 \mu\text{g/hr}$ 였고, 이는  $65 \mu\text{g/일}$  또는  $40 \text{ U/일}$ 과 동일한  $1.7 \text{ U/hr}$ 에 상당한다. ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프 모델 2006은 44일에 외식된다.

[0347] 도 15c 및 도 15d는 모델 2004 또는 모델 2006 ALZET<sup>®</sup> 삼투 펌프를 사용하여 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여한 마우스의 혈장 중 대사산물 수준 및 CBS 활성을 각각 비교하는 그래프를 도시한다. 모델 2004 펌프가 모델 2006 펌프보다 67% 많은 효소를 분배함에도 불구하고, 두 마우스 그룹은 모두 유사한 혈장 대사산물 프로파일을 갖는 것으로 관찰되었다. Hcy의 혈장 수준은 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에서 상당히 감소된 것으로 관찰되었고, 게다가 Cys 혈장 수준의 많지 않은 증가만이 있었다.

[0348] **실시예 15. 20NHS PEG-htCBS C15S의 장기간 연속적 투여는 KO 마우스 및 I278T 마우스에서 골다공증을 예방한다**

[0349] KO 마우스 및 I278T 마우스에서의 20NHS PEG-htCBS C15S의 장기간 연속적 투여의 효과를 실시예 1의 프로토콜을 사용하여 이중-에너지 x-선 흡광광도분석법(DEXA)을 사용하여 분석하였다.

[0350] A. KO 마우스의 골 무기질화 및 체성분

[0351] 골 무기질 밀도(BMD) 및 골 무기질 함량(BMC)을 3개의 마우스 그룹에 대해 DEXA에 의해 분석하였다: +/- 건강한 이형접합 대조 그룹( $n=4M+6F$ ), 이환된 KO 대조 그룹( $n=5$ 마리 수컷+13마리 암컷) 및 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)-처리된 KO 마우스( $n=6$ 마리 수컷+15마리 암컷). 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에게 2일령부터 약 5개월령까지  $7.5 \text{ mg/kg}$ 을 주 3회 피하(SC) 투여하였다. 신생아 치사를 방지하기 위해 모든 +/- KO 마우스를 초기 5주(2일령부터 35일령까지) 동안 처리하였다.

[0352] 도 16a, 도 16b, 도 16c, 도 16d 및 도 16e는 각각 3개의 마우스 그룹 간의 BMD( $\text{g/cm}^2$ ), BMC(g), 총 질량(g), 제지방량(g) 및 지방 함량(%)을 비교하는 그래프이다. 표 19는 두 대조 그룹과 비교한 처리 그룹에서의 차이에 대한 유의성을 측정하기 위해 사용된 P-값을 제공한다.

**표 19**

**KO 마우스에서 DEXA 측정된 파라미터에 대한 P-값**

	BMD	BMC	총 질량	제지방량	지방 함량
+/- 건강한 그룹 대 +/- 이환된 그룹	<0.001	0.011	0.045	0.675	<0.001
+/- 건강한 대조 그룹 대 처리 그룹	0.006	0.609	0.749	0.160	0.071
-/- 이환된 대조 그룹 대 처리 그룹	<0.001	<0.001	0.027	0.049	0.045

[0353]

[0354] 0.05의 P-값을 유의성을 측정하기 위한 역치로서 설정하였다. 처리 그룹은 두 대조 그룹 모두보다 유의적으로 더 높은 BMD를 가졌다. 처리 그룹은 또한 녹아웃 대조 그룹보다 유의적으로 더 높은 BMC, 총 질량, 제지방량 및 지방 함량을 가졌다. 따라서, KO 마우스의 20NHS PEG-htCBS C15S로의 처리는 극심한 골다공증을 완전히 예방하고 체성분(총 질량, 제지방량 및 지방 함량)을 개선시켰다.

[0355] B. KO 마우스의 혈장 대사산물

[0356] 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스에서, Hcy, Cth 및 Cys의 혈장 수준을 연구 과정 동안 격주로 측정하였고 도 16f에 도시한다. 혈액 샘플을 초기에는 41일째(실제 시간 0을 나타내는 것이 아니라 오히려 주사 72시간 후의 대사산물 수준을 나타낸다)에 수집하고, 이어서 45일째부터는 샘플을 매 2주마다 수집하였다. Hcy 수준(중간 선)은 45일째에 약  $180 \mu\text{M}$ 부터 45일째에 약  $90 \mu\text{M}$ 로 감소하는 것으로 관찰되고 연구 기간 내내 상기 수준에서 안정된 상태를 유지하였다. Cys 수준(최상단 선)은 처리로 정상화되었고 45일째에  $100 \mu\text{M}$  미만부터 45일째에 약  $200 \mu\text{M}$ 이며 연구 과정 동안 지속되었다. Cth 수준(하단 선)은 연구 지속 기간 내내 대략  $50 \mu\text{M}$ 에서 진

동하였다.

[0357] 혈장 대사산물은 상기 기재한 바와 같은 동일한 마우스/그룹을 사용하여 측정하였다. 대사산물 Hcy, Cth, Cys 및 Met의 종점 수준을 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 KO 마우스(각 대사산물에 대한 우측 막대)에게 마지막 주사 한지 24시간 후에 측정하고, 도 16g에 도시된 바와 같이 미처리된 건강한 +/- 마우스(좌측 막대) 및 이환된 -/- KO 마우스(중간 막대)와 비교하였다. 표 20은 두 대조 그룹과 비교한 처리 그룹에서의 대사산물 수준의 차이에 대한 유의성을 측정하기 위해 사용된 P-값을 제공한다.

표 20

KO 마우스의 대사산물 수준 변화에 대한 P-값

	Hcy	Cth	Cys	Met
+/- 건강한 대조 그룹 대 -/- 이환된 대조 그룹	<0.001	<0.001	<0.001	0.133
+/- 건강한 대조 그룹 대 -/- 처리 그룹	<0.001	<0.001	0.024	0.039
-/- 이환된 대조 그룹 대 -/- 처리 그룹	0.005	0.005	0.005	0.005

[0358]

[0359] 0.01의 P-값을 유의성을 결정하기 위한 역치로서 설정하였다. Hcy 수준은 유의적으로 저하되는 것으로 관찰되었고, Cth 수준은 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었고, Cys 수준은 미처리된 KO 마우스와 비교해 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여받은 KO 마우스에서 정상화되었다. Met 수준은 미처리된 KO 마우스에서 다소 상승되는 것으로 관찰되었지만 그룹들 간에 유의적으로 상이하지는 않았다.

[0360] 따라서, KO 마우스에게 20NHS PEG-htCBS C15S를 연속적으로 장기간 투여하는 것은 미처리된 -/- KO 마우스와 비교하여 Hcy, Cth 및 Cys 혈장 수준을 유의적으로 개선시키는 것으로 관찰되었다. Cys의 혈장 수준은 건강한 +/- 마우스 값으로 정상화되었다(즉, 건강한 +/- 마우스 값과 유의적으로 상이하지 않았다). 대사산물 데이터는 DEXA에 의하여 결정된 표현형과 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다.

[0361] C. I278T 마우스에서의 골 무기질화 및 체성분

[0362] 골 무기질 밀도(BMD) 및 골 무기질 함량(BMC)을 3개의 I278T 마우스 그룹에 대해 DEXA에 의해 분석하였다: +/- 건강한 이형접합 대조 그룹(n=10M+11F), -/- 이환된 동형접합 I278T 대조 그룹(n=6M+8F) 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스 (n=6M+6F). 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)-처리된 I278T 마우스에게 6개월령 부터 13개월령까지 7.5 mg/kg을 주당 3회 피하(SC) 투여하였다. 도 17a, 도 17b, 도 17c, 도 17d 및 도 17e는 각각 3개 마우스 그룹들 간의 BMD(g/cm<sup>2</sup>), BMC(g), 총 질량(g), 제지방량(g) 및 지방 함량(%)를 비교하는 그래프이다. 표 21은 대조 그룹과 비교한 처리 그룹에서의 차이에 대한 유의성을 측정하기 위해 사용된 P-값을 제공한다.

표 21

I278T 마우스에서 DEXA 측정된 파라미터에 대한 P-값

	BMD	BMC	총 질량	제지방량	지방 함량
+/- 건강한 그룹 대 -/- 이환된 그룹	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001
+/- 건강한 대조 그룹 대 -/- 처리 그룹	0.473	0.832	<0.001	0.037	<0.001
-/- 이환된 대조 그룹 대 -/- 처리 그룹	<0.001	<0.001	0.027	0.331	<0.001

[0363]

[0364] 0.05의 P-값을 유의성을 결정하기 위한 역치로서 설정하였다. 모든 DEXA 측정된 파라미터는 건강한 이형접합 마우스와 비교하여 이환된 I278T 마우스에서 유의적으로 감소되었다. I278T 마우스의 20NHS PEG-htCBS C15S로의

처리는 미처리된 I278T 마우스와 비교하여 제지방량을 제외한 모든 파라미터의 유의적 보정을 야기하였다. 사실상, 골 무기질화(BMD) 값은 건강한 이형접합 대조 마우스와 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스 간에 구별하기 어려운 것으로 관찰되었다. 따라서, I278T 마우스의 20NHS PEG-htCBS C15S로의 처리는 또한 극심한 골다공증을 완전히 예방하고 체성분(총 질량, 제지방량 및 지방 함량)을 개선시켰다.

#### [0365] D. I278T 마우스의 혈장 대사산물

[0366] 혈장 대사산물을 상기 기재한 바와 같이 동일한 마우스/그룹에서 측정하고 서로 비교하였다. 대사산물 Hcy, Cth, Cys 및 Met의 혈장 수준은 도 17f에 도시되어 있다. 좌측 막대는 +/- 건강한 대조 그룹에 대한 대사산물 수준을 나타내고 중간 막대는 -/- 이환된 대조 그룹에 대한 대사산물 수준을 나타낸다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에서의 각 대사산물의 수준은 우측 막대로 표시되어 있다. 표 22는 +/- 건강한 대조 그룹, -/- 이환된 대조 그룹 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스 간에 혈장 대사산물 수준의 차이에 대한 유의성을 측정하기 위해 사용된 P-값을 나타낸다.

표 22

혈장 대사산물의 변화의 P-값

	Hcy	Cth	Cys	Met
+/- 건강한 그룹 대 -/- 이환된 그룹	<0.001	0.667	<0.001	0.021
+/- 건강한 대조 그룹 대 처리 그룹	<0.001	<0.001	<0.001	0.140
-/- 이환된 대조 그룹 대 처리 그룹	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0367] 0.01의 P-값을 유의성을 결정하기 위한 역치로서 설정하였다. Hcy 수준은 유의적으로 저하되는 것으로 관찰되었고, Cth 수준은 유의적으로 증가되는 것으로 관찰되었고, Cys 수준은 미처리된 이환된 I278T 대조 그룹과 비교하여 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여받은 I278T 마우스에서 유의적으로 개선되었지만, 정상화되지는 않았다. Met 수준은 미처리된 이환된 I278T 마우스에서 다소 상승되었고 처리 후 I278T 마우스에서 +/- 이형접합 마우스 수준으로 유의적으로 정상화되었다.

[0369] 이러한 결과들은, Cys 수준의 +/- 수준으로의 정상화가 처리된 I278T 그룹에서 관찰되지 않았다는 점을 제외하고는, KO 마우스를 이용한 DEXA 연구의 결과들과 유사하였다. 따라서, I278T 마우스에게 20NHS PEG-htCBS C15S를 연속적 장기간 투여하는 것은 미처리된 -/- 동형접합 이환된 마우스와 비교하여 Hcy, Cth, Cys뿐만 아니라 Met 혈장 수준을 유의적으로 개선시켰다. 이들 대사산물 데이터는 DEXA에 의해 평가된 표현형을 확증하는 것으로 관찰되었다.

[0370] 따라서, 20NHS PEG-htCBS C15S의 장기간 연속적 투여는 골다공증을 예방하고 KO 마우스 모델과 I278T 마우스 모델 둘 다에서 체성분을 개선시키며, 호모시스테인증과 연관된 대사산물 수준을 개선시키는데 효과적이다.

#### [0371] 실시예 16. 200MAOB PEG-htCBS C15S의 연속적 장기간 투여는 I278T 마우스에서 간 대사작용 및 기능을 개선시키고 염증을 감소시키고 혈장 지질을 정상화시킨다

[0372] I278T 마우스에게 200MAOB PEG-htCBS C15S를 투여하는 것은 간 글루코오스 대사, 산화환원 상황 및 메틸화 가능성 뿐만 아니라 지질 대사작용을 개선시키는 것으로 관찰되었다. 간 기능은 영향을 받지 않은 것으로 관찰되었고, 염증성 사이토킨 및 혈장 지질은 처리에 의해 정상화된 것으로 관찰되었다.

#### [0373] A. I278T 마우스에서 간 기능 및 지질 대사작용에 미치는 장기간 200MAOB PEG-htCBS C15S 투여의 효과

[0374] 200MAOB PEG-htCBS C15S로 장기간 처리한 후 혈장 바이오마커를 I278T 마우스에서 측정하여 간 기능, 염증 및 혈장 지질 수준을 분석하였다. 3개의 I278T 마우스 그룹을 분석하였다: +/- 건강한 이형접합 대조 그룹(n=3), -/- 이환된 동형접합 대조 그룹(n=3) 및 200MAOB PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스(n=3). 200MAOB PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에게 6개월령부터 13개월령까지 7.5 mg/kg를 주당 3회 피하(SC) 투여하였다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 및 알칼리성 포스파타제(ALP)의 효소 활성; 사이토킨 IL-12(p40), IL-12(p20), IL-13, G-CSF, MCP-1 및 TNF- $\alpha$ 의 농도; 혈장 지질(총 콜레스테롤, HDL 콜



레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 트리글리세라이드)의 농도를 혈장에서 측정하였다(결과는 제시하지 않음). AST, ALT 및 ALP 혈장 활성이 참조 범위 내에 있었기 때문에 간 기능은 영향을 받지 않은 것으로 관찰되었다. 염증성 사이토킨, 특히 IL-12(p40) 및 IL-13은 미처리된 I278T 마우스에서 상승되어 있고 처리 그룹의 경우 정상화된 것으로 관찰되었다. 혈장 지질 패널은 미처리된 I278T 마우스가 건강한 +/- 대조 그룹과 비교해 유의적으로 더 높은 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 가진 한편, 트리글리세라이드는 상당히 감소되었음을 나타냈다. 지질 프로파일은 200MAOB PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스에서 완전히 정상화되었다.

[0375] B. I278T 마우스에서 간 대사작용에 미치는 장기간 200MAOB PEG-htCBS C15S 투여의 효과

[0376] 상기 기재한 바이오마커들 이외에, 핵 자기 공명(NMR) 대사체학을 수행하여 동일한 마우스의 간 조직을 분석함으로써 I278T 마우스에 대한 장기간 200MAOB PEG-htCBS C15S 처리의 효과를 조사하였다. 간 조직으로부터의 대사산물을 친수성 및 친유성 용매로 추출하고 NMR을 사용하여 개별적으로 정량하였다.

[0377] 친수성 분획 중의 글리코젠, 글루코스, 글루타티온(GSH), 총 글루타티온 및 메틸-그룹의 농도는 도 18a에 나타낸다. 좌측 막대는 +/- 건강한 대조 그룹에서의 농도를 나타내고, 중간 막대는 이환된 대조 그룹에서의 농도를 나타낸다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에서의 농도는 우측 막대로 나타낸다. 소수성 분획의 경우, 총 불포화 지방산(UFA), 다불포화된 지방산(PUFA), t-지방산, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> 지질 및 총 지질은 도 18b에 나타낸다. 좌측 막대는 +/- 건강한 대조 그룹에서의 농도를 나타내고, 중간 막대는 -/- 이환된 대조 그룹에서의 농도를 나타낸다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스에서의 농도는 우측 막대로 나타낸다. I278T 마우스에게 200MAOB PEG-htCBS C15S를 투여하는 것은 간 글루코스 대사작용, 산화환원 상황 및 메틸화 가능성 뿐만 아니라 지질 대사작용을 개선시키는 것으로 관찰되었다.

[0378] **실시예 17. 장기간 20NHS PEG-htCBS C15S 처리는 I278T 마우스에서 안구 결함을 개선시킨다**

[0379] 혈장 중 대사산물 수준의 변화를 I278T (+/-) 건강한 이형접합 대조 그룹 마우스, 미처리된 -/- 이환된 동형접합 대조 마우스 및 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 -/- 동형접합 I278T 마우스에서 측정하였다. 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)-처리된 마우스에게 2일령부터 약 4개월령까지 7.5 mg/kg을 주 3회 피하(SC) 투여하였다. 6주령부터 4개월령까지의 혈장 대사산물 수준의 변화는 도 19a에 나타낸다. 마우스를 2일령부터 처리하였기 때문에 수준은 주사 후 72시간째부터 측정하기 시작하였다.

[0380] 예상대로, 미처리된 동형접합 I278T 대조 그룹은 도 19a에 도시된 바와 같이 건강한 이형접합 대조 그룹과 비교하여 유의적으로 상승된 Hcy 수준 및 감소된 Cys 수준을 가졌다. 미처리된 동형접합 I278T 마우스에서의 Hcy 수준은 연구 동안 대략 400 μM 내지 440 μM에서 진동하였으며, 이는 기능적 CBS의 부족으로 인한 연속적 Hcy 축적의 증거이다. 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 I278T 마우스에서, Hcy 수준은 230 μM부터 약 70 μM로 감소하였으며 남은 연구 기간 내내 상기 수준을 유지하였다. 또한, 20NHS PEG-htCBS C15S의 활성은 연구 기간 내내 혈장 Cth를 약 50 μM까지 축적시켰으며 보다 중요하게는 혈장 Cys 수준을 약 230 μM으로 정상화시켰으며 상기 수준은 연구 기간 내내 유지되었다.

[0381] I278T 마우스로부터의 안구를 분석하고 3개의 그룹들 간에 비교하였다. 건강한 이형접합 대조 그룹 및 미처리된 -/- 이환된 I278T 대조 그룹은 각각 도 19b 및 도 19c에 비교되어 있으며, 미처리된 동형접합 대조 그룹은 경선줄 바로 위의 수정체 적도에서 종결되었고 수정체 후면에서 성장하지 않은 더 적고 더 가는 섬모체소대 섬유를 갖는 것으로 관찰되었다. 도 19d 및 도 19e에 도시된 20NHS PEG-htCBS C15S-처리된 마우스로부터의 샘플에서, 섬모체소대 섬유 밀도의 강화 및 수정체의 후면으로의 섬모체소대 섬유의 "재성장"의 징후가 관찰되었다. 이러한 관찰결과는 20NHS PEG-htCBS C15S로의 장기간 처리가 I278T 동형접합 마우스에서 안구 결함에 긍정적 효과를 미쳤다는 증거이다.

[0382] **실시예 18. 20NHS PEG-htCBS C15S 투여와 Met-제한 식이의 병용은 I278T 마우스에서 Hcy 수준을 정상화시킨다**

[0383] 식이 연구를 I278T 마우스에서 수행하고 이를 연구하였다. 10주령 마우스의 혈장 대사산물: +/- I278T(대조 그룹), -/- I278T(음성 대조 그룹) 및 -/- 20NHS PEG-htPBS(OT-58) 처리된 마우스. 각 그룹을 하위그룹으로 추가로 나누었다: 일반적 식이를 섭취하는 하나의 하위그룹(8.2 g/kg Met TD.01084 식이 + 아연 물)(REG) 및 메티오닌-제한 식이를 섭취하는 하나의 하위그룹(0.5 g/kg Met TD.110591 식이 + 베타인 물)(MRD). 처리는 5주령에서 시작하였다.

[0384] 도 20a는 6개의 그룹들 간의 Hcy 수준을 나타낸다. 높은 수준의 Hcy(356 μM, 이는 I278T 마우스를 사용한 상기 실험과 일치한다)는 REG 식이 중인 -/- 마우스에서 관찰되었다. Hcy 수준은 REG 식이 중인 처리된 그룹에서 현



저하게 낮았다(51  $\mu$ M). 비교적 높은 수준의 Hcy(41  $\mu$ M)은 또한 OT-58 처리에 의해 정상화된 MRD 식이 중인 +/- 마우스에서 관찰되었다(MRD 중인 +/- 마우스에서 2  $\mu$ M 대 4  $\mu$ M).

[0385] 도 20b는 6개의 그룹들 간의 Cth 수준을 나타낸다. 높은 수준의 Cth는 두 식이 모두를 섭취하는 중인 -/- OT-58-처리된 마우스에서 관찰되었으며, REG 식이 마우스의 경우 113  $\mu$ M인 것에 대비하여 MRD 식이 마우스의 경우 10  $\mu$ M이었고, 그 수준은 기질 이용율로 인해 REG 식이 중인 마우스에서 더 높았다. REG 식이와 MRD 식이 간의 유사한 경향이 나머지 그룹에 대해 관찰되었으며, 이는 높은 수준의 Cth(특히 REG 식이 중인 -/- 마우스에서)가 식이에서 기인한다는 증거가 된다고 본 발명자는 믿고 있다.

[0386] 도 20c는 6개의 그룹들 간의 Cys 수준을 나타낸다. Cys 수준은 오직 REG 식이 중인 -/- 마우스에서만 상당히 감소된 것으로 관찰되었으며, 반면에 MRD 식이 및/또는 OT-58 처리는 Cys의 혈장 수준을 정상화시키는 것으로 관찰되었다.

[0387] 도 20d는 6개의 그룹들 간의 Met 수준을 나타낸다. Met의 혈장 수준은 REG 식이 중인 -/- 마우스에서 높은(1313  $\mu$ M) 것으로 관찰되었으며, 이는 이전에 표준 식이 중인 I278T 마우스에서는 관찰되지 않았다. 이러한 높은 Met 수준은 오직 D17-19 미처리된 CBS KO 마우스에서만 이전에 관찰되었다. PBS 주사를 받은 REG 식이 중인 -/- I278T 마우스에서의 높은 Met 수준은 동물 시설에 의해 제공된 STD 식이와 비교하여 본 실험에서 대조 식이로서 사용된 REG 식이 중의 더 높은 Met 함량의 결과일 가능성이 있었다.

[0388] 그럼에도 불구하고, REG 식이 중인 -/- 마우스에서 OT-58 처리는 Met 수준을 정상화시키지 않았지만 Met 수준(201  $\mu$ M 내지 66  $\mu$ M)을 현저하게 감소시킨 것으로 관찰되었다. MRD 식이 중인 마우스에서의 Met 수준은 정상 이거나 정상보다 더 낮은 것으로 관찰되었으며 이는 처리로부터의 단지 경미한 효과만을 나타낸다.

[0389] 따라서, Met-제한 식이와 20NHS PEG-htCBS C15S 투여의 병용은 I278T 마우스에서 대사산물 수준을 정상화시키는 것으로 관찰되었다. 호모시스틴뇨증 대상체에서 20NHS PEG-htCBS C15S(OT-58)와 비제한(단지 완화된 것이 아님) 식이의 공동투여는 Hcy를 50  $\mu$ M로 감소시켰다.

[0390] **실시예 19: 래트에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학**

[0391] **A. 단일 투약 약동학**

[0392] 래트에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학을 평가하기 위해, 야생형 스프라그 다울리 래트에게 정맥내(IV) 또는 피하(SC) 경로를 통해 20NHS PEG-htCBS C15S의 단일 투여량을 주사하였다. 표 23에 나타난 바와 동일하거나 매우 유사한 연구 디자인을 사용하여 3가지의 별개의 단일 투약 PK 연구를 병행하였다. 세번째(반복 투약) PK 연구(그룹 7 내지 9)의 디자인을 첫번째 투약 후 데이터 추출이 가능하고 이에 따라 단일 투여량 PK 연구(그룹 1 내지 6)와의 병행이 가능하도록 조정하였다. 혈장을 표 23에 열거된 지정된 시간에서 수집하고 실시예 1에 상세히 기재된 방법들을 사용하여 CBS 활성화에 대해 분석하였다.

**표 23**

**20NHS PEG-htCBS C15S를 사용한 스프라그 다울리 래트에서의 단일 투약(그룹 1 내지 6)**

**및 반복 투약(그룹 7 내지 9) PK 연구의 디자인**

그룹	래트 (nM/nF)	경로	투여량 (mg/kg)	샘플링 (최초 주사 후 경과시간)
1	2M/2F	IV	4	0, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 120
2		SC	8	0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168
3		SC	24	
4	3M/0F	IV	4	0, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 120
5		SC	8	0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168
6		SC	24	
7	(주요) + 3M/3F (회복)	SC	4	주요 그룹: 0, 24, 48, 240, 264, 288, 312, 336, 360, 384, 408 회복 그룹: 0, 8, 12, 32, 38, 404, 432, 476, 527, 577
8		SC	8	
9		SC	24	

[0393]

[0394] 4 mg/kg(IV), 8 mg/kg(SC) 및 24 mg/kg(SC)의 단일 IV 또는 SC 볼루스 투약 후 수컷 및 암컷 래트에서의 20NHS PEG-htCBS C15S의 비활성을 도 21a 및 도 21b에 나타낸다. IV 주사를 통해 수컷 및 암컷 래트에게 20NHS PEG-

htCBS C15S를 투여한 후의 결과는 거의 겹쳐질 수 있었다. 그러나, SC 경로를 통한 8 mg/kg 또는 24 mg/kg의 20NHS PEG-htCBS C15S의 단일 투여 후 수컷과 암컷 간에 상당한 차이가 관찰되었다. 도 21a(4 mg/kg IV) 및 도 21b(8 mg/kg 및 24 mg/kg SC)의 결과로부터 계산된 수컷과 암컷에서의 IV 경로와 SC 경로 둘 다의 PK 파라미터는 표 24에 나타난다. 래트에서 SC로부터의 20NHS PEG-htCBS C15S 생체이용율은 강력하게 성별-의존적으로 수컷(19 내지 21%)은 암컷(약 36%)에 비해서 덜 흡수하였으며, 래트에서의 생체이용율은 HO 마우스에서 관찰된 생체이용율(52 내지 83%)보다 현저하게 낮았다.

표 24

스프라그 다울리 래트에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 PK 파라미터

PK 파라미터	단위	SC 수컷	SC 암컷	SC 수컷	SC 암컷	IV 수컷	IV 암컷
투여량	mg/kg	8	8	24	24	4	4
AUC <sub>0-t</sub> (obs 면적)	mU-h/μl	2703	4505	9269	13135	7231	6165
AUC <sub>0-t</sub> /투여량	mU-h/μl/(mg/kg)	338	563	386	547	1808	1541
생체이용율	%	18.7	36.5	21.3	35.5	100	100
t <sub>1/2-A</sub>	h	14.6	8.9	13.6	13.0	N/A	N/A
t <sub>1/2-E</sub>	h	44.2	40.1	51.2	41.1	40.0	34.8
t <sub>max</sub> (obs)	h	48	24	38	48	N/A	N/A
c <sub>max</sub>	mU/μl	32.7	58.2	110.0	166.3	N/A	N/A
c <sub>p0</sub>	mU/μl	N/A	N/A	N/A	N/A	182.1	186.2
c <sub>max</sub> /투여량	mU/μl/(mg/kg)	4.1	7.3	4.6	6.9	N/A	N/A
MRT (면적)	h	65.6	76.8	66.1	79.8	52.9	45.5

[0395]

[0396]

B. 반복 투약 약동학

[0397]

장기간 독성 연구를 수행하기 위한 종으로서 래트를 추가 평가하기 위해, 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학을 매 48시간마다 4 mg/kg(낮은), 8 mg/kg(중간) 또는 24 mg/kg(높은) 20NHS PEG-htCBS C15S의 총 9회의 SC 주사가 투여되는 3개의 스프라그 다울리 그룹에서 측정하였다. 연구 디자인은 표 23에 요약되어 있다. 실험은 24일의 기간 동안 수행하였다. 혈장을 수집하고 실시예 1에 상세히 기재된 방법들을 사용하여 CBS 활성에 대해 분석하였다.

[0398]

시간 경과에 따라서 플롯팅된 반복 투약 PK 연구에 대한 CBS 비활성은 도 21c에 도시된 바와 같이 중간 투여량 8 mg/kg에 예시되어 있다(유사한 현상은 낮은 투여량(4mg/kg)뿐만 아니라 높은 투여량(24 mg/kg 그룹)의 경우에도 관찰되었다). 화살표는 주사를 나타낸다. CBS 활성의 측정은 혈장에서 관찰되지 않았고, 피크 CBS 활성의 현저한 저하는 첫번째 6회 주사 후에 관찰되었다. 이렇게 혈장 중 CBS 활성의 예상된 정상상태 수준을 달성하지 못한 예상 밖의 래트의 불능은 암컷보다 수컷에서 더 극심한 것으로 관찰되었으며, 이는 수컷의 감소된 생체이용율 때문일 가능성이 가장 크다(상기 단일 투약 PK 데이터를 참조). 후속적인 20NHS PEG-htCBS C15S 투여에서의 CBS 활성의 현저한 약화는 면역반응 때문일 가능성이 있으며, 이것은 래트가 장기간 독성 연구에 적합한 종이라는 증거이다.

[0399]

**실시예 20. 원숭이에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학 및 약력학**

[0400]

장기간 독성 연구를 위한 비-인간 영장류 모델을 평가하고 인간 유효 투여량을 상대성장 스케일링을 통해 추정하기 위해, 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학적 및 약력학적 연구를 야생형 시노몰구스 원숭이(마카카 파시쿨라리스)에서 수행하였다.

[0401]

A. 원숭이에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 단일 투약 약동학 및 약력학

[0402]

단일 투약 PK 연구의 경우, 4마리(n=2마리 수컷+2마리 암컷) 원숭이의 3개 실험 그룹을 사용하여 실험을 수행하였다. 첫번째 그룹에는 IV 주사를 통해 2 mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여하였다. IV 주사 후 0, 0.083, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 72, 120 및 192시간째에 채혈하였다. 두번째 및 세번째 그룹에게는 SC 주사를 통해 2 mg/kg 또는 6 mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S를 투여하였다. 혈액은 SC 주사 후 0, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 192, 240 및 336시간째에 수집하였다. 수집된 혈장을 CBS 활성에 대해 분석하고 황 아미노산

대사산물(호모시스테인, 시스타티오닌 및 시스테인) 수준을 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다.

[0403]

20NHS PEG-htCBS C15S가 단일 2 mg/kg 투여량으로 IV 투여되거나 2 mg/kg 또는 6 mg/kg 투여량으로 SC 투여된 원숭이에서의 시간 경과에 따른 CBS 비활성 곡선은 도 22a에 나타낸다. 단일 주사 후 IV 및 SC 투여 둘 다에 대한 계산된 PK 파라미터는 표 25에 요약되어 있다. 원숭이에서의 20NHS PEG-htCBS C15S의 생체이용율은 약 80%인 것으로 계산되었으며, 이는 5 mg/kg의 SC 투여량이 투여된 HO 마우스의 생체이용율(83%)과 거의 동일하다. 원숭이의 혈장으로부터의 20NHS PEG-htCBS C15S의 제거 반감기는 IV 데이터셋으로부터는 67시간이고 SC 데이터셋으로부터는 73시간인 것으로 계산되었다.  $C_{max}$ 는 2 mg/kg의 SC 투여량에서 40.8 mU/ $\mu$ l이고 6 mg/kg의 SC 투여량에서 114.9 mU/ $\mu$ l인 것으로 계산되었다.

[0404]

표 25는 원숭이에서 20NHS PEG-htCBS C15S로 실시된 단일 투여량 실험으로부터 수득된 PK 파라미터를 열거한다.

표 25

20NHS PEG-htCBS C15S를 시노물구스 원숭에게 단일 IV 및 SC 주사한 후의 PK 파라미터

PK 파라미터	단위	SC	SC	IV
투여량	mg/kg	2	6	2
AUC <sub>0-t</sub> (obs 면적)	mU-h/ $\mu$ l	5263±299	15743±629	5942±156
AUC <sub>0-t</sub> /투여량	mU-h/ $\mu$ l/(mg/kg)	2761±160	2727±119	2971±78
생체이용율	%	80.8±4.7	79.9±3.5	100
t <sub>1/2-A</sub>	h	7.9±1.0	9.7±1.0	N/A
t <sub>1/2-E</sub>	h	72.9±1.1	72.8±1.7	66.7±1.2
t <sub>max</sub> (obs)	h	26.2±2.6	32.4±2.4	N/A
$C_{max}$	mU/ $\mu$ l	40.8±2.0	114.9±7.5	N/A
cp <sub>0</sub>	mU/ $\mu$ l	N/A	N/A	96.5±2.8
$C_{max}$ /투여량	mU/ $\mu$ l/(mg/kg)	20.4±1.0	19.2±1.3	N/A
MRT (면적)	h	116.3±2.4	116.2±5.0	89.9±2.4
CL (obs 면적)	$\mu$ l/h/kg	N/A	N/A	933±53

[0405]

[0406]

주사된 원숭이가 건강한 야생형이고 자연적으로 낮은 Hcy 수준(호모시스틴뇨증의 무린 모델에서 150 내지 500  $\mu$ M인 것과 비교해 3 내지 5  $\mu$ M)를 가졌기 때문에, 20NHS PEG-htCBS C15S의 단일 IV 또는 SC 투여량 후 약력학적 효과는 예상되지 않았다. Hcy 및 Cys의 혈장 수준의 유의적 변화는 주사된 원숭이에서 관찰되지 않았다. 그러나, IV 투여한지 8시간 후 및 SC 투여한지 8시간 및 48시간 후에 초기 수준과 비교하여 혈장 중 Cth의 유의적 급등이 관찰되었고, 이는 심지어 이환되지 않은 건강한 원숭이에서도 PD 효과의 증거가 되었다(도 22b). CBS가 Cth를 형성하는 것으로 공지된 유일한 효소이기 때문에 Cth 혈장 수준의 급등은 20NHS PEG-htCBS C15S 투여에서 비롯된 것일 가능성이 있다. 또한, CBS 효소는 정상적으로는 혈장 중에서 순환 및 기능하지 않는다. 20NHS PEG-htCBS C15S 투여에 의해 혈장에 형성된 Cth는 Cys 또는 Hcy보다 더 천천히 청소되는 것으로 관찰되었다. 따라서, 관찰된 PD 효과가 더 뚜렷하거나 투여량-의존적인지 여부를 결정하기 위해, 대사산물, 특히 Cth를 다중-투여량 연구에서 추가로 모니터링하였다.

[0407]

B. 원숭이에서 20NHS PEG-htCBS C15S의 반복 투약 약동학 및 약력학

[0408]

반복 투약 실험을 수행하였으며, 여기서는 4마리 원숭이의 세 그룹(주요 하위그룹은 1마리 수컷+1마리 암컷 및 회복 하위그룹은 1마리 수컷 +1마리 암컷)에게 매 72시간마다 1 mg/kg(낮은), 3 mg/kg(중간) 또는 10 mg/kg(높은) 20NHS PEG-htCBS C15S의 총 6회 연속적 SC 투여량을 투여하였다. 혈액을 첫번째 주사 후 0, 32시간째, 72시간째, 104시간째, 144시간째, 176시간째, 216시간째, 248시간째, 288시간째, 320시간째, 360시간째, 392시간째 및 408시간째에 주요 하위그룹의 원숭이로부터 수집하고, 한편 회복 하위그룹의 동물들은 최초 주사 후 432

시간째, 456시간째, 480시간째, 528시간째 및 696시간째의 추가 시점에서도 채혈하였다. 혈장을 수집하고 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 CBS 활성 및 황 아미노산(호모시스테인, 시스타티오닌, 시스테인, 란티오닌 및 호모란티오닌) 수준에 대해 분석하였다.

[0409] 매 3일마다 6회의 연속적 SC 주사 후 낮은(1 mg/kg), 중간(3 mg/kg) 및 높은(10 mg/kg) 투여량 그룹에 대한 시간 경과에 따른 20NHS PEG-htCBS C15S 비활성 곡선은 도 23a에 나타난다. 시노물구스 원숭이에게 20NHS PEG-htCBS C15S를 피하 투여하는 것은 16일 동안 매 3일마다 6회 투약한 후 예측가능하고 투여량-의존적인 CBS 활성의 혈장 수준을 초래하였다. 래트의 반복 투약 PK 연구에서의 결과와 대조적으로, 야생형 원숭이에게 20NHS PEG-htCBS C15S를 반복 투여한 후에는 CBS 활성의 약화가 검출되지 않았다. 각각의 후속적인 효소 투여는 완전히 예측가능한 혈장 중 CBS 활성의 축적을 야기하였으며 첫번째 3회 투약 후 본질적으로 정상상태에 도달하였다. 추가로 투약은 정상상태를 유지시키는 것으로 관찰되었으며, 이때 제거 속도는 흡수 속도와 동등하여 일정한 피크 및 저점 혈장 수준으로 이어졌다. 정상상태에서의 평균 피크 혈장 농도( $C_{max-ss}$ )는 36 내지 39 mU/ $\mu$ l 범위의 투여량의 경우에 정상화되었으며 정상상태에서의 저점 혈장 수준( $C_{min-ss}$ )은 23 내지 28 mU/ $\mu$ l 범위의 투여량의 경우에 정상화되었다. 20NHS PEG-htCBS C15S의 제거율은 로그-선형인 것으로 관찰되었고, 이로써 혈장 20NHS PEG-htCBS C15S 활성이 절반으로 감소되는데 필요한 시간이 일정하도록 한 1차 동력학임이 확인된다(데이터는 제시하지 않음). 제거 반감기는 16일째에 마지막 투약 후 회복 동물에서 추정되었으며 49시간 내지 64시간이었는데, 즉 20NHS PEG-htCBS C15S의 단일 SC 투약 후에 원숭이에서 관찰된 반감기(73시간)와 유사하였으며, 이는 다수회 투약이 제거율을 변화시키지 않았다는 증거였다.

[0410] 바이오마커인 시스타티오닌의 혈장 수준은 심지어 이환되지 않은 건강한 원숭이(단일 투약 원숭이 데이터를 참조)에서도 20NHS PEG-htCBS C15S 활성을 나타내는 지표인 것으로 확인되었다. 낮은(1 mg/kg), 중간(3 mg/kg) 및 높은(10 mg/kg) 투여량이 72시간 간격으로 6회 주사된 원숭이에서의 결과는 도 23b에 제시한다. Cth 수준은 혈장 중 20NHS PEG-htCBS C15S 활성의 피크 및 저점과 밀접한 상관관계가 있었으며 투여량-의존적인 것으로도 관찰되었다. 호모시스테인 및 시스테인에 대한 투여량 그룹들 간에 명백한 차이는 관찰되지 않았다(데이터는 제시하지 않음).

[0411] CBS에 의해 생산된 티오에테르 시스타티오닌 이외에도, 황화수소 생산의 대용 마커로서 선택된 2가지 티오에테르 란티오닌 및 호모란티오닌을 선택된 시점에서 반복 투약 연구로부터의 원숭이 혈장 샘플에서 측정하였다. 황화수소는 다수의 생리학적 과정에서 급부상한 중요한 신호전달 분자이며 따라서 최근 몇 년간 치료학적 적용을 위해 집중적으로 연구되었다.

[0412] 표 26은 SC 경로를 통해 상이한 투여량으로 20NHS PEG-htCBS C15S를 반복 투여한 후의 야생형 원숭이에서의 시스타티오닌, 란티오닌 및 호모란티오닌의 혈장 수준을 제시한다. 첫번째 주사 후 0시간(투약 전), 176시간 및 392시간째의 대사산물 수준이 보고되어 있다. 데이터는 평균±평균의 표준오차(SEM)( $\mu$ M 단위)(n=4)로서 제시한다.

표 26

**20NHS PEG-htCBS C15S의 반복 투여 후 원숭이에서의 티오에테르 시스타티오닌, 란티오닌 및 호모란티오닌의 혈장 수준**

대사산물	1 mg/kg			3 mg/kg			10 mg/kg		
	0 h	176 h	392 h	0 h	176 h	392 h	0 h	176 h	392 h
시스타티오닌	982 ±72	4010 ±236	4272 ±333	982 ±72	5629 ±284	5893 ±390	982 ±72	7098 ±12	9318 ±288
란티오닌	25±2	46±9	69±7	25±2	103±7	109±9	25±2	281±43	353±38
호모란티오닌	38±5	64±7	72±5	38±5	64±4	60±10	38±5	50±3	53±4

[0413]

[0414] 야생형 원숭이에게 20NHS PEG-htCBS C15S를 반복 투여하는 것은 시스타티오닌 및 란티오닌의 혈장 수준을 증가시키는 것으로 관찰되었지만, 호모란티오닌 수준은 유의적인 영향을 받지 않았다. 시스타티오닌 및 란티오닌의 증가는 투여량에 정비례하는 것으로 관찰되었으며, 투여량 의존성은 시스타티오닌보다 란티오닌의 경우에 더 현저한 것으로 관찰되었다.

[0415] C. LC/MS/MS C15S 활성 검증

[0416] 내부 표준으로서 시스타티오닌 M+8( $^{13}\text{C}_2\text{D}_6$ )를 사용하여 CBS 활성의 생성물로서 시스타티오닌 M+4를 측정하기 위한 LC/MS/MS를 사용하여 개발된 생물분석학적 방법을 개발하고 원숭이와 인간 혈장 샘플 둘 다에 대해 검증하였고, 따라서 상기 방법을 약동학 및 독성학 연구뿐만 아니라 임상 시험의 샘플 중에서 CBS 활성을 측정하기 위해 사용할 수 있다. 효소 검정은 본질적으로 실시예 1에 기재된 바와 같되 다음과 같이 변형시켜서 수행하였다. 중수소화된 D,L-호모시스테인 M+4를 사용하여 반응 혼합물 중에 비표지된 L-세린으로 반응을 개시하였다. 37°C에서 30분 동안 항온배양한 후, 6N HCl을 사용하여 산성화시켜 효소 반응을 중단시키고, 표지된 반응 생성물(시스타티오닌 M+4)을 EZ:faast 키트(Phenomenex, 미국)를 사용하여 추출하였다. 간략하게 언급하면, 50  $\mu\text{l}$ 의 샘플(교정 표준, QC 샘플 또는 효소 반응)을 빙상에서 튜브 내에서 혼합하고 내부 표준 용액(시스타티오닌 M+8, 0.25 ng/ $\mu\text{l}$ ) 및 250  $\mu\text{l}$  물을 사용하여 빙으로부터 보호시켰다. 혼합물을 MCX 카트리지 컬럼(Waters)을 이용하여 추출하였다. 용출된 매질(메탄올 중 6N 암모니아)을 45°C에서 증발 건조시켰다. 건조 잔사를 EZ:faast 키트의 용출 매질에 용해시키고 유도체화하고 키트 제조업자의 프로토콜에 따라서 액체-액체 추출하였다. 처리량을 증가시키고 시간을 절약하기 위해 고체 상 추출을 추출 플레이트로 자동화하였다. 측정가능한 시스타티오닌 M+4 농도가 효소의 기원과 관계없이 관찰되었다(혈장 샘플 또는 대조 그룹에 존재하는 htCBS C15S 또는 C15S/ME-200GS 또는 혈장 샘플 중 미량의 내인성 원숭이/인간 CBS). 발생한 측정치가 적절한 농도 범위(5.00 내지 1500 nM)의 높은 부분에 있었기 때문에 보정 범위에 많은 관심을 기울였다.

[0417] 하기 표 12 내지 14는 기질로서 D,L-호모시스테인 M+4를 사용한 LC/MS/MS 및 기질로서 L-[ $^{13}\text{C}$ -U]-세린을 사용한 방사측정 검정에 의해 측정된 C15S/ME-200GS 비활성의 비교를 나탄낸 것이다. "n.d."는 "측정되지 않음"을 나타낸다. 표 27은 2 mg/kg의 단일 투여량이 IV 주사된 시노몰구스 원숭이로부터의 혈장 샘플의 한 세트에서 C15S/ME-200GS 비활성의 비교를 나타낸다.

표 27

2 mg/kg의 단일 IV 투약 후 원숭이 혈장 샘플에서 2 가지 검정에 의해 측정된 C15S/ME-200GS 비활성의 비교

시간 (h)	LC/MS/MS 검정	방사측정 검정	차이 (%)
0.083	88.865	95.741	7.182
0.167	81.065	90.049	9.977
0.25	80.315	88.891	9.648
0.5	81.815	85.342	5.243
1	75.415	80.992	6.887
2	71.765	78.984	9.140
4	67.415	77.809	13.359
8	61.715	70.357	12.283
24	47.815	55.865	14.411
72	28.915	31.601	8.500
120	17.180	18.908	9.142
192	8.490	9.182	7.534

[0418]

[0419] 표 28은 2 mg/kg의 단일 투여량이 SC 주사된 시노몰구스 원숭이로부터의 혈장 샘플의 한 세트에서 C15S/ME-200GS 비활성의 비교를 나타낸다.



표 28

2 mg/kg의 단일 SC 투약 후 원숭이 혈장 샘플에서 2 가지 검정에 의해 측정된 C15S/ME-200GS 비활성의 비교

시간 (h)	LC/MS/MS 검정	방사측정 검정	차이 (%)
1	n.d.	2.842	n.d.
2	6.479	5.801	11.694
4	11.108	11.207	0.884
8	19.913	22.164	10.155
24	n.d.	40.293	n.d.
48	32.538	36.658	11.238
72	27.888	30.670	9.069
96	20.768	23.536	11.758
120	16.958	18.608	8.866
192	9.063	9.496	4.551
240	5.908	5.963	0.915
336	2.273	2.441	6.900

[0420]

[0421]

표 29는 6 mg/kg의 단일 투여량이 SC 주사된 시노물구스 원숭이로부터의 혈장 샘플의 한 세트에서 C15S/ME-200GS 비활성의 비교를 나타낸다.

표 29

6 mg/kg의 단일 SC 투약 후 원숭이 혈장 샘플에서 2 가지 검정에 의해 측정된 C15S/ME-200GS 비활성의 비교

시간 (h)	LC/MS/MS 검정	방사측정 검정	차이 (%)
1	3.065	3.739	18.029
2	7.640	9.180	16.778
4	18.365	22.263	17.877
8	41.090	50.194	18.138
24	85.190	111.081	23.308
48	86.090	109.292	21.229
72	74.840	95.722	21.815
96	59.940	73.072	17.971
120	56.340	56.427	0.154
192	24.190	31.513	23.238
240	14.440	19.203	24.801
336	4.784	5.807	17.608

[0422]

[0423]

실시예 21. 동물로부터 인간으로의 PK/PD 데이터 외삽

[0424]

대부분의 경우에, 약력학적 반응을 유도하기 위해 필요한 약물 혈장 수준은 수용체 또는 효소 표적의 종-특이적 서열 변이로 인해서 종에 걸쳐서 상이하다. 예를 들면, 인간 단백질에 대한 항체는 표적 단백질 서열에서의 종 차이로 인해서 무린 및 인간 표적 단백질에 대해 매우 상이한 친화도를 가질 수 있다. 20NHS PEG-htCBS C15S의 경우, 생물학적 표적은 종에 걸쳐서 동일한 아미노산, Hcy이다. 더욱이, 표적 조직으로의 약물 분포는 종-특이적 생체분포로 인해서 종에 걸쳐서 다양할 수 있고, 약물 혈장 수준에 의해 용이하게 예측될 수 없다. 그러나, 20NHS PEG/C15S에 대한 "표적 조직"은 혈장에서의 약동학적 파라미터의 종간 비교로부터 외삽된 인간 값의 예측에 고도의 확실성을 부여하는 혈장이다.

[0425]

본원의 연구는 7.5 mg/kg의 SC 투여량을 사용하여 마우스에서 실시하였으며, 투여량-반응 연구는 5 mg/kg의 투

여량이 바이오마커 Hcy, Cth 및 Cys의 혈장 수준의 조정 측면에서 효능을 최대화시켰음을 입증하였다. 5 mg/kg의 투여량을 사용하고 인간(70 kg)과 마우스(0.025 kg) 간의 체표면적의 차이를 보정하였을 때, 0.4 mg/kg의 투여량이 유효한 인간 등가 투여량(HED)인 것으로 추정되었다. 상기 투여량에서 피크 혈장 수준은 3060 mU-h/mL의 AUC를 갖는 마우스에서 50 mU/ $\mu$ L였다. 20NHS PEG-htCBS C15S 활성화에 대한 기질(Hcy 및 세린)이 종에 걸쳐서 동일하고 작용 부위가 혈액 풀(pool) 그 자체이기 때문에, 이들 파라미터는 20NHS PEG-htCBS 임상 시험에서 효능을 위해 필요한 표적 인간 혈장 수준의 정확한 추정치를 제공한다.

[0426]

약동학적 연구를 다양한 투여량-수준에서 단일 및 다수회 SC 주사한 후에 CBSDH의 무린 동물 모델, 정상 스프라그 다울리 래트 및 정상 시노글루스 원숭이에서 실시하였다. 또한, 단일 투약 약동학적 연구를 20NHS PEG-htCBS C15S의 IV 투여 후 모든 3가지 종에서 실시하여 SC 투여 후의 모든 3가지 종에서의 생체이용율을 평가하였다. SC 투여 후 마우스, 래트 및 원숭이 모델에 대해 보정된 약동학적 파라미터 생체이용율(F%)의 요약을 하기 표에 제공한다.

표 30

종 전체에 걸친 OT-58 (htCBS C15S ME-200GS)에 대한 PK 파라미터 및 체표면적 스케일링으로부터 예측된 인간 값

파라미터: 단위:	T <sub>1/2</sub> h	AUC/투여량 (mU-h/mL)/(mg/kg)	C <sub>max</sub> /투여량 (mU/ $\mu$ L)/(mg/kg)	t <sub>max</sub> h	F%
종/성별					
마우스/암수 둘 다	20	612	10	24	83%
래트/수컷	48	363 (1452)*	4.4 (17)**	35	20%
래트/암컷	41	555 (1233)*	7.1 (16)**	29	36%
원숭이/ 암수 둘 다	73	2744	20	29	81%
인간 예상값	177	7474	34	NA	NA

[0427]

\*는 래트의 평균 AUC/투여량이 80% 생체이용율에 대해 보정되어 1343 (mU-h/mL)/(mg/kg)에 필적하였음을 나타낸다. \*\*는 래트의 평균 c<sub>max</sub>/투여량이 80% 생체이용율에 대해 보정되어 16.5 (mU/ $\mu$ L)/(mg/kg)에 필적하였음을 나타낸다.

[0428]

[0429]

이러한 결과들에 따르면, 20NHS PEG-htCBS C15S는 모든 3가지 종에서 SC 투여 후에 혈류로 천천히 흡수되었다. 흡수 반감기는 단일 SC 주사 후 마우스에서는 5 내지 12시간, 래트에서는 10 내지 16시간 및 원숭이에서는 8 내지 10시간으로 종에 걸쳐서 유사하였으며, 이는 개별적 동물에서 24시간 내지 48시간 범위인 T<sub>max</sub> 값으로 이어졌다. 제거 반감기(T<sub>1/2</sub>)는 마우스에서 20시간, 래트에서 44.5시간 그리고 원숭이에서 73시간이었다. SC 투여 후 혈액으로 흡수된 20NHS PEG-htCBS C15S의 비율(F%)은 마우스(5 mg/kg 투여량)와 원숭이(1, 3 또는 10 mg/kg의 투여량에서) 모델 둘 다에서 80% 초과였다. 그러나, 혈액으로 흡수된 20NHS PEG-htCBS C15S의 퍼센트는 수컷 래트에서는 단지 20%였고 암컷 래트에서는 36%였다. 표 30에서, 래트의 AUC/투여량 및 C<sub>max</sub>/투여량을 80% 생체이용율(표 30에서 삽입된 값들)에 대해 보정하여 종간 비교가 동일한 F%에서 이루어질 수 있도록 하였다.

[0430]

로그 체중과 다양한 PK 파라미터(AUC/투여량, 투여량당 C<sub>max</sub> 및 T<sub>1/2</sub>)의 로그 간에 선형 상관관계가 존재하는지 여부를 결정하기 위해, 모든 3가지 종(마우스, 래트 및 원숭이)에서 생체이용율이 80%라 가정하여 종간 비교를 체표면적 스케일링에 기반하여 실시하였다. 이들 파라미터에서 선형 상관관계는 20NHS PEG-htCBS C15S에 대한 약동학적 파라미터가 체표면적으로 스케일링되고 따라서 인간 값을 예측할 수 있을 것임을 나타냈다. 선형 상관관계는 전임상 데이터로부터 임상적 투여량 및 투약 용법을 예측할 수 있게 한다.

[0431]

종에 걸쳐서 20NHS PEG-htCBS C15S의 약동학적 파라미터 AUC, C<sub>max</sub> 및 T<sub>1/2</sub>에 대해 선형 상관관계가 관찰되었다. 도 24a(AUC/투여량), 도 24b(C<sub>max</sub>/투여량) 및 도 24c(T<sub>1/2</sub>)에 도시된 바와 같이, 투여량에 대해 보정된 연관된 PK 파라미터와 각 종의 로그 체중 간에 우수한 선형 관계가 관찰되었다. 각 파라미터마다 로그 인간의 체중(70 kg)으로 외삽하여, 인간 대상체에 대한 AUC/투여량, C<sub>max</sub>/투여량 및 T<sub>1/2</sub>를 계산하였다. 예측된 인간 값은 표 30

에 제공한다.

[0432] 인간에서 외삽된/예측된 반감기는 약 175시간 또는 7.3일이었다. 예측된 인간 유효 투여량은 마우스에서의 유효 투여량(5 mg/kg)으로부터 상대성장 스케일링에 의해 70 kg 인간에서 0.4 mg/kg인 것으로 계산되었다. 34 mU/μL(mg/kg당)의 예측된 인간  $c_{max}$  및 48 내지 72시간의  $T_{max}$  범위를 사용하여, 인간에서의 단일 투약 PK 곡선에 대한 가상적인 곡선을 작도하였으며, 이는 도 24d에 도시되어 있다. E 절편은 43.079 mg/μL이었고, 반감기는 176.737시간이었다. 비교 목적으로 마우스와 원숭이로부터의 데이터도 또한 도 24d에 도시한다. 표 31은 인간에 대해 추정된 외삽된 농도를 제공한다.

표 31

인간에 대한 외삽된 농도

시간 (h)	농도 (mg/μL)
0	0
1	0.9
2	2
4	4.3
8	8
20	20
48	33.3
72	34
96	28
240	16.7
336	12
408	8.5

[0433]

[0434] 도 24d로부터 도출된 PK 파라미터로부터, 인간에서는 1차 동력학이라 가정하여 다수회의 투약 PK 곡선을 모델링 하였으며, 이는 도 24e에 도시되어 있다.

[0435] A. 인간에서 가상적인 반복 투약 PK 곡선

[0436] 도 24f는 정상상태 혈장 수준으로의 접근 동안 주 1회 투여된 1 mg/kg의 SC 투여량에서 인간에서의 20NHS PEG-htCBS C15S에 대한 예측된 PK 값 및 예측된 정상상태에서의 피크 및 저점 수준(담회색)을 도시한다. 도 24g는 정상상태 혈장 수준으로의 접근 동안 주 2회 투여된 1 mg/kg의 SC 투여량에서 인간에서의 20NHS PEG-htCBS C15S에 대한 예측된 PK 값 및 이러한 투약 간격에서 예측된 인간에서의 피크 및 저점 수준(담회색)을 도시한다. 표 32는 주당 1회 및 주당 2회 투여된 0.33 mg/kg, 0.66 mg/kg 및 1 mg/kg의 SC 투여량에서 인간에서 예측된 20NHS PEG-htCBS C15S의 피크 및 저점 혈장 수준을 비교한 것이다(인간에서 생체이용율이 80%라 가정함).

표 32

인간에서 예측된 혈장 수준(생체이용율은 80%라 가정함)

인간 투여량	1 mg/kg		0.66 mg/kg		0.33 mg/kg	
투약 간격	1x/주 (168h)	2x/주 (84h)	1x/주 (168h)	2x/주 (84h)	1x/주 (168h)	2x/주 (84h)
초기 $C_{max}$ , mU/μL	34	34	22.6	22.6	11.3	11.3
피크 @ SS, mU/μL	67.9	123	45.2	82	22.6	41
저점 @ SS, mU/μL	46.2	109	30.8	69	15.4	34.5
$C_{min}$	22.3	29.0				
$T_{max}$ @ SS (hr)	38.2	27.4				

[0437]

[0438] 상기 계산으로부터, 주 1회 인간 환자에게 SC 투여된 0.66 mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S의 투여량은 정상상태에서 31 내지 45 mU/μL의 범위의 혈장 수준을 야기할 것이라 예측되었다. 유사하게, 주 2회 투여된 0.33의 투여량은 (약 8회 투약 후) 정상상태에서 35 내지 41 mU/μL의 범위의 혈장 수준을 야기할 것이라 예측되었다. 이러한 예측들은 마우스와 원숭이 둘 다에서 관찰된 바와 같이 피하 생체이용율이 80%라 가정한다. 이러한 20NHS PEG-htCBS C15S 투여량은 또한 마우스에서의 혈장 수준(50 mU/μL의 피크 수준)과 유사한 혈장 수준에 대한 유

효 범위 내의 피크 및 저점 혈장 수준을 산출할 것으로 예상된다. 추가로, 이러한 투여량들은 단독의 뮤린 연구로부터 예측된 인간 유효 투여량 0.4 mg/kg에 상응한다. 전임상 종에 걸쳐 체중과 PK 파라미터의 선형 상관관계는 상대성장 스케일링(체표면 스케일링)을 가능하게 하여 종에 걸쳐 값들을 비교함으로써 인간에서 PK 파라미터 AUC, Cmax 및 제거 반감기를 예측할 수 있게 한다.

[0439] 인간에서 유효 투여량을 예측하는 두 방법 모두(마우스 데이터로부터 직접 예측 및 3가지 종에 걸쳐서 상대성장 스케일링에 의해 예측)는 유효 투여량 예측(HED)의 측면에서 일치하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 생체이용율이 80%라 가정하면, 주 2회 투여되는 0.33 mg/kg 또는 주 1회 투여되는 0.66 mg/kg의 제안된 투여량은 인간 임상 시험에서 유효 투여량일 것이다.

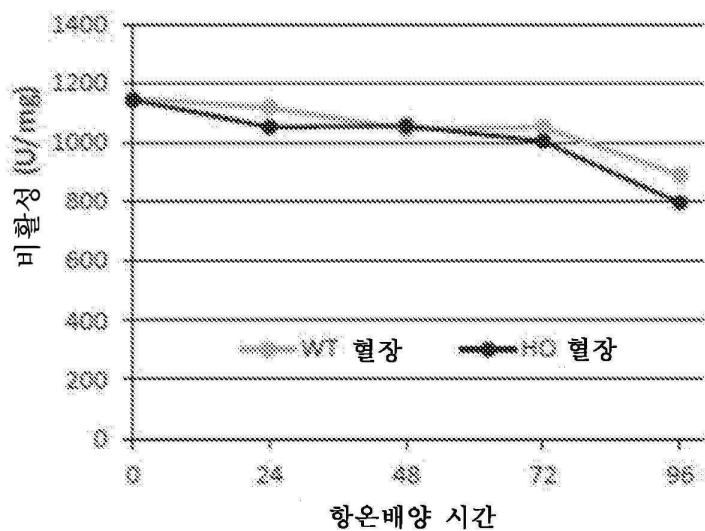
[0440] 관련 기술의 상기 예들 및 이와 관련된 한정은 배타적이 아닌 예시적인 것으로 의도된다. 관련 기술의 다른 한정은 본 명세서를 읽고 도면을 검토할 때 당업자에게 자명해질 것이다.

[0441] 다수의 예시적인 측면 및 실시양태들이 상기 거론되었지만, 당업자는 특정 변형, 순열, 추가 및 이들의 하위조합을 인식할 것이다. 따라서, 하기 첨부된 청구범위 및 추후에 도입될 청구범위는 모든 이러한 변형, 순열, 추가 및 하위조합을 그의 진정한 취지 및 범위 내에 포함하는 것으로 해석된다.

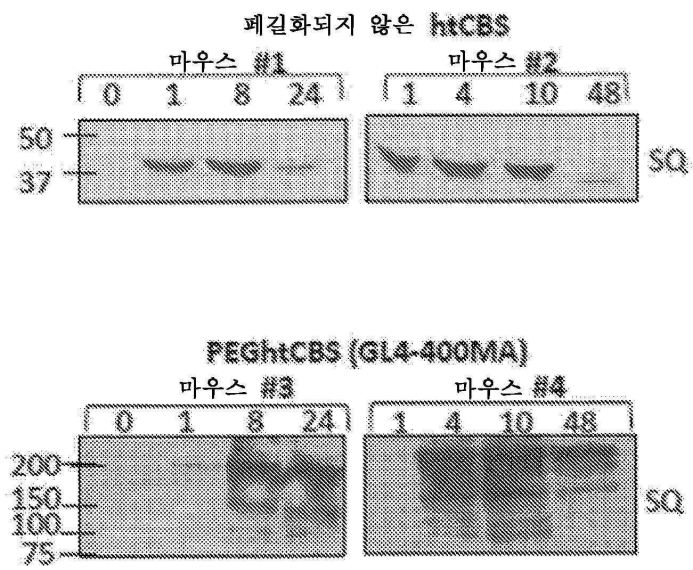
[0442] 본 출원이 속하는 분야의 기술 수준을 보다 충분히 설명하기 위해, 본 출원에서 인용되거나 확인된 모든 간행물, 특허출원, 특허공보, 과학 문헌 등은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

## 도면

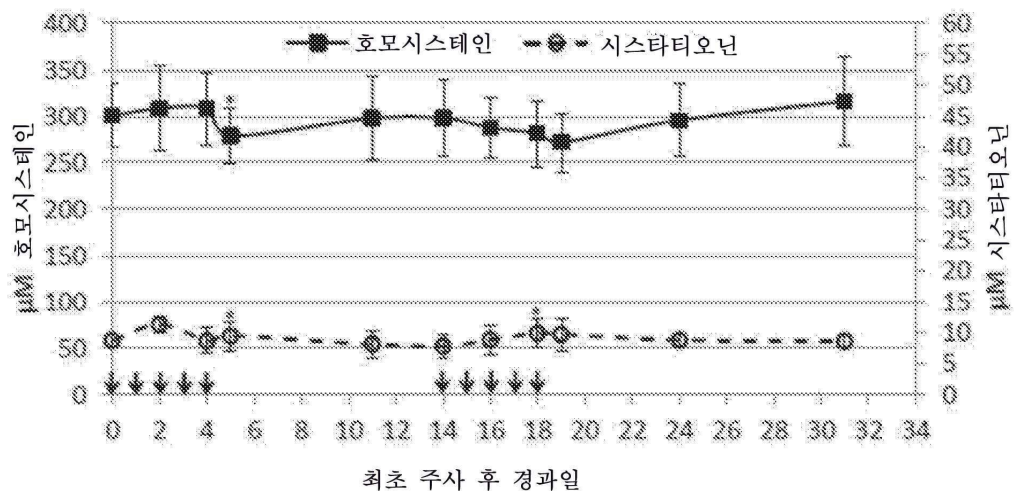
### 도면1a



도면1b



도면2

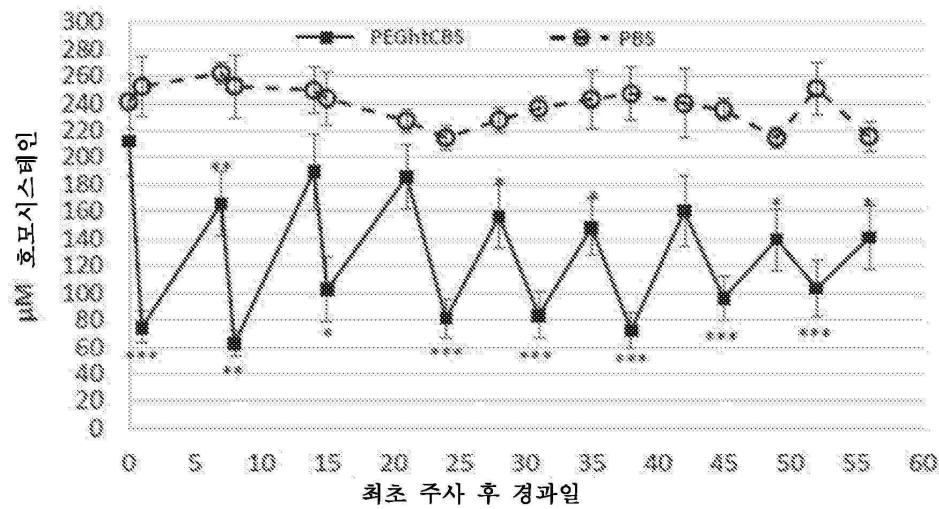


도면3

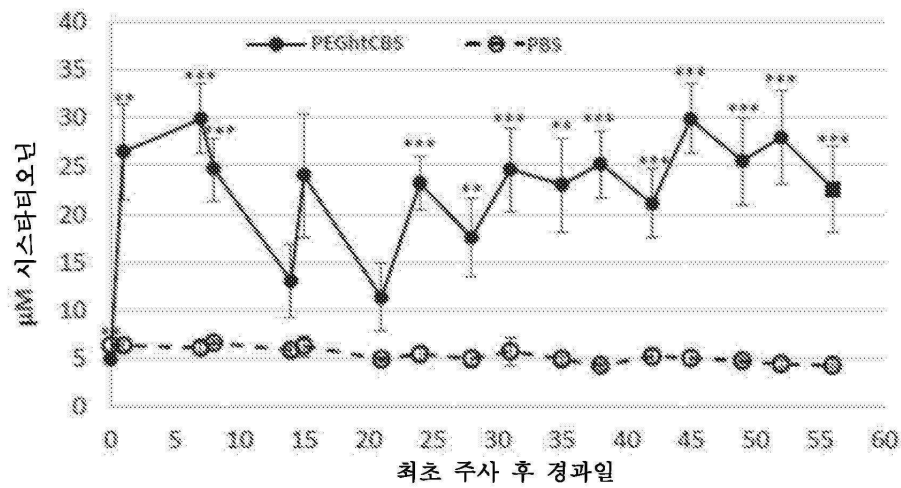




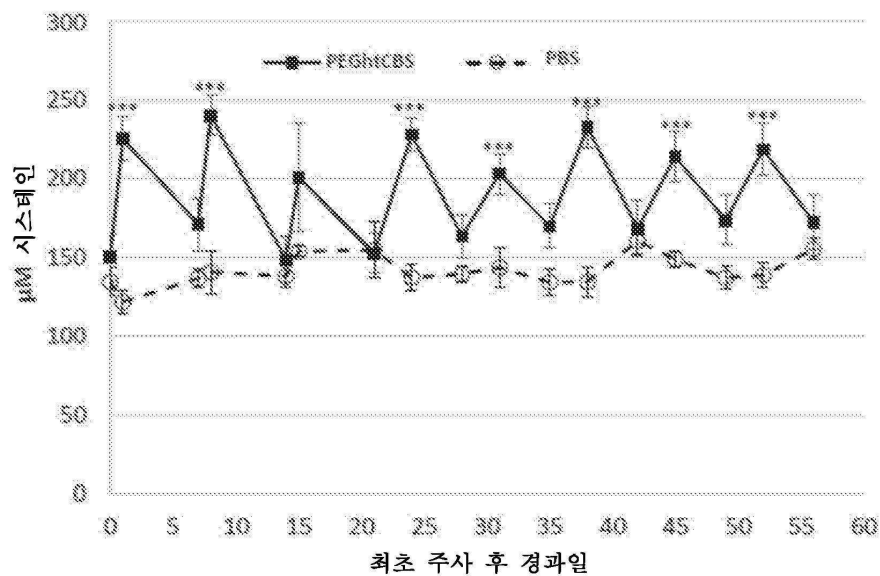
도면4a



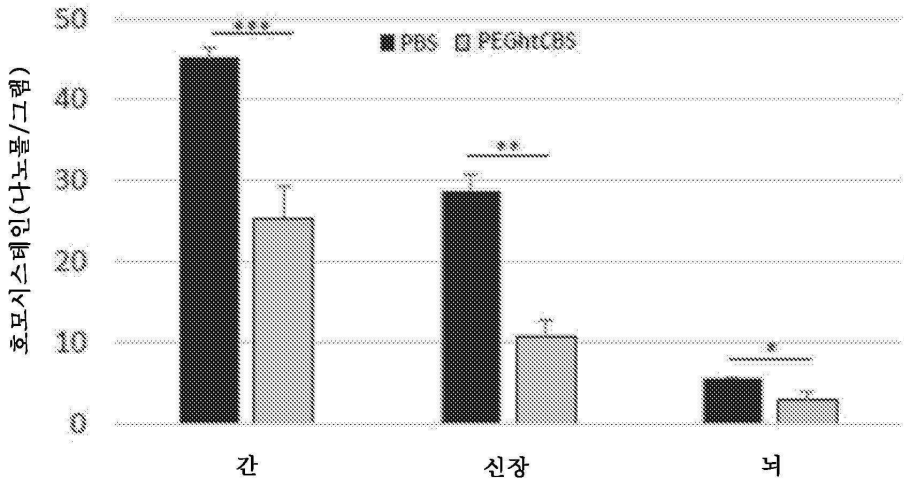
도면4b



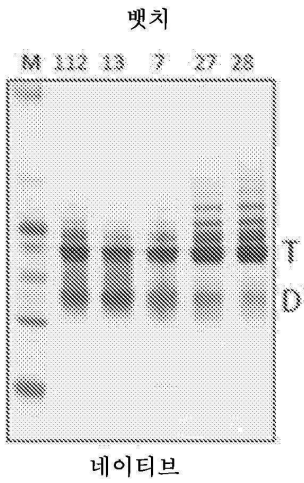
도면4c



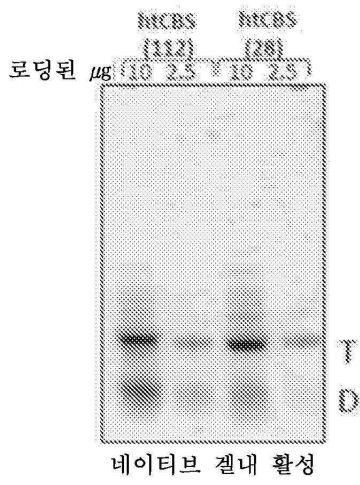
도면4d



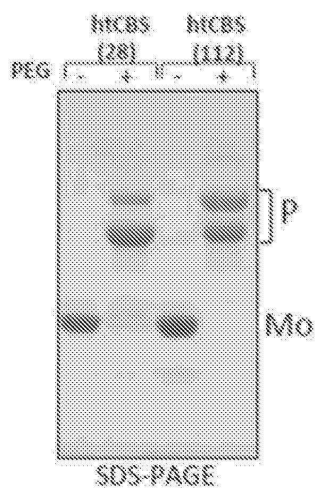
도면5a



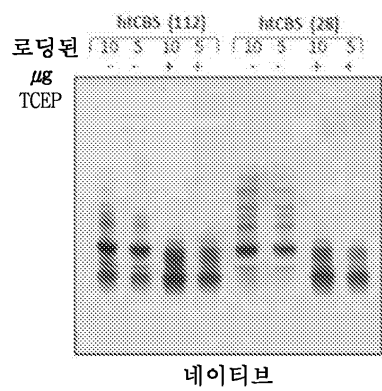
도면5b



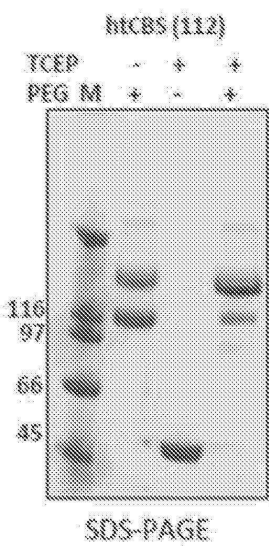
도면5c



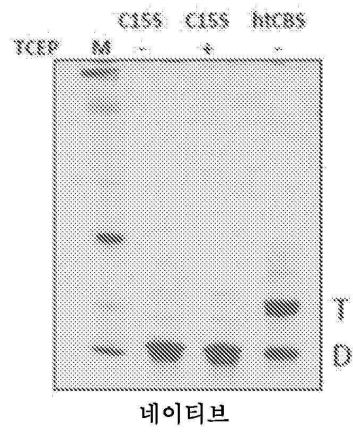
도면5d



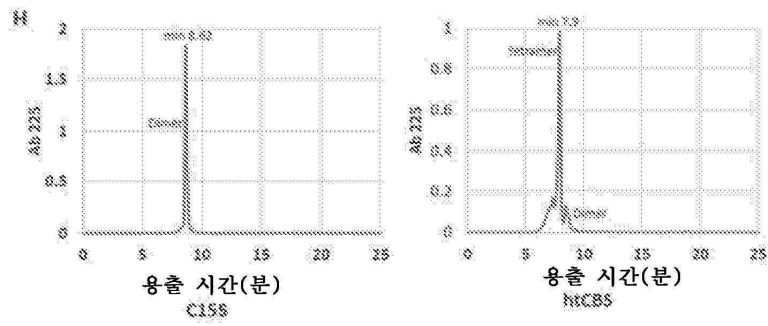
도면5e



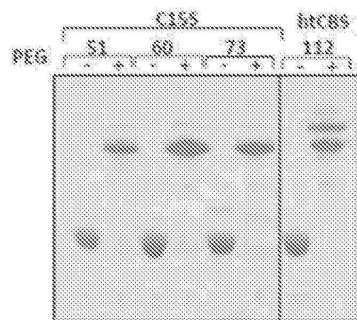
도면5f



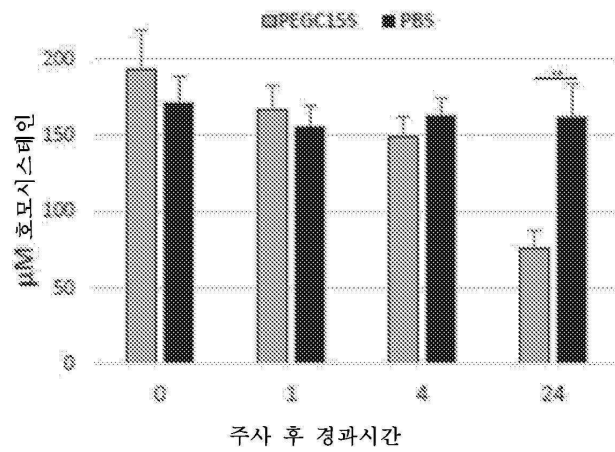
도면5g



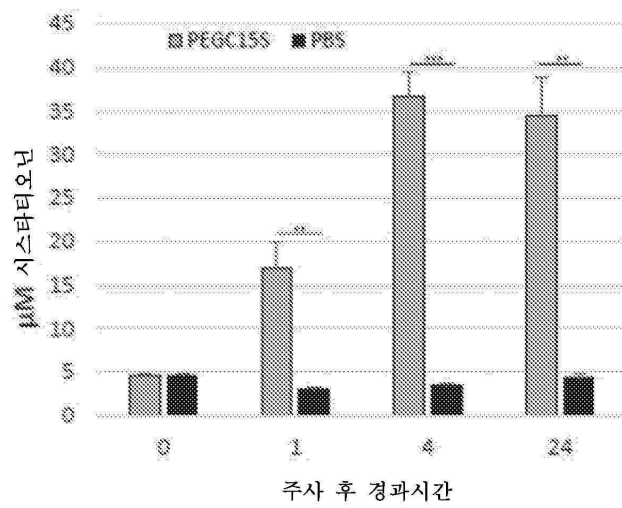
도면5h



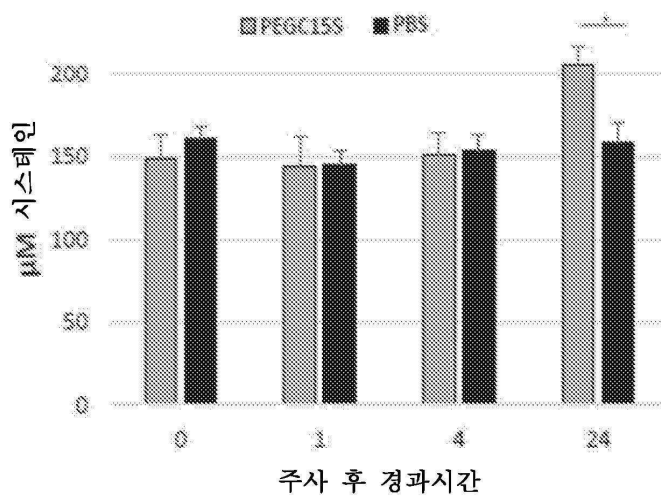
도면6a



도면6b

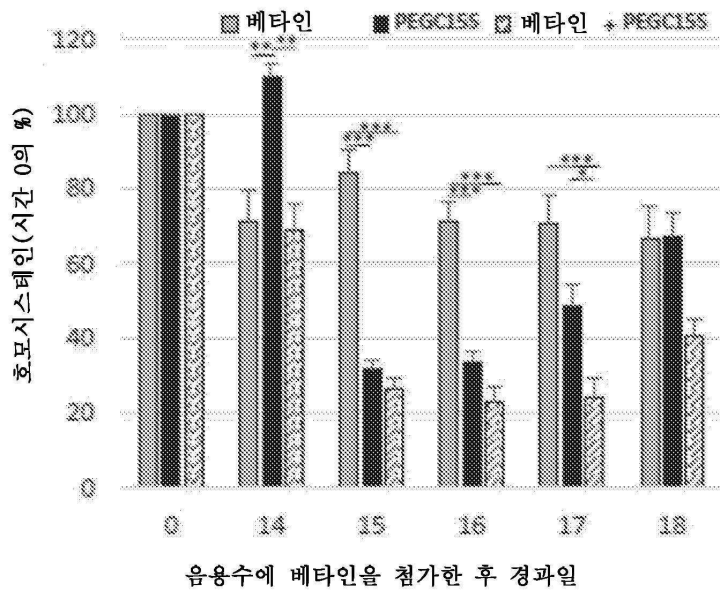


도면6c

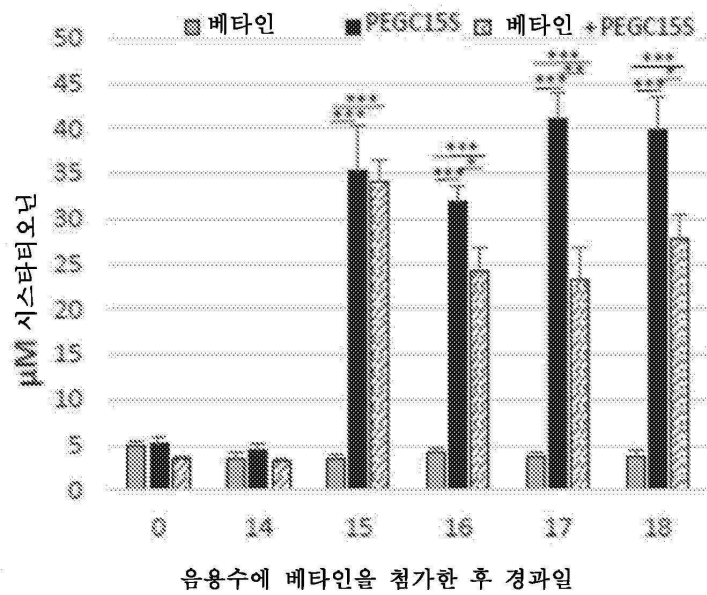




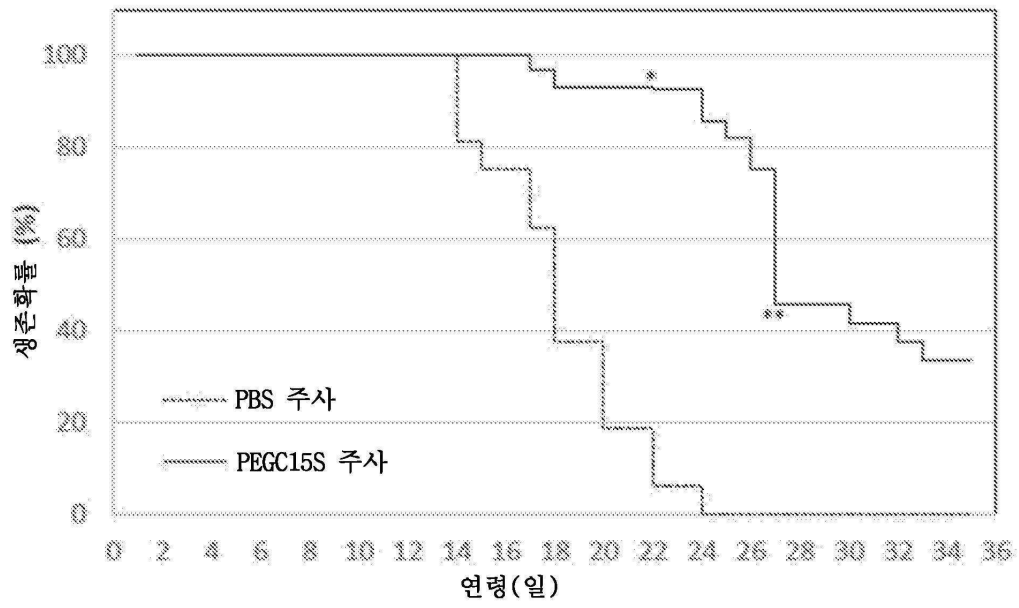
도면7a



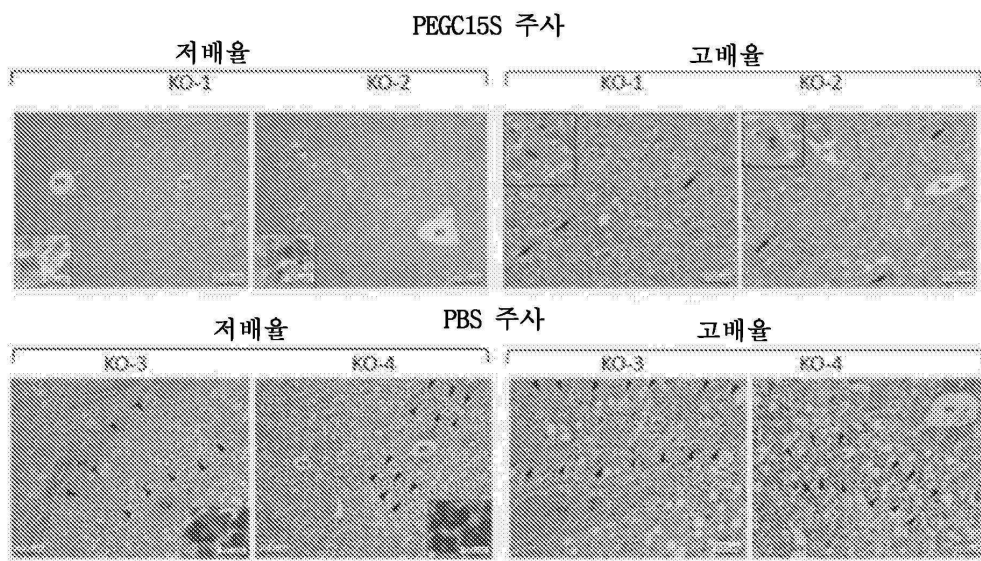
도면7b



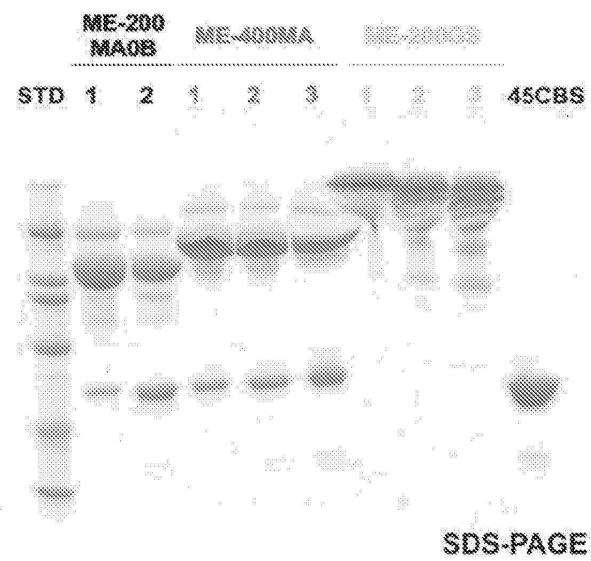
도면8a



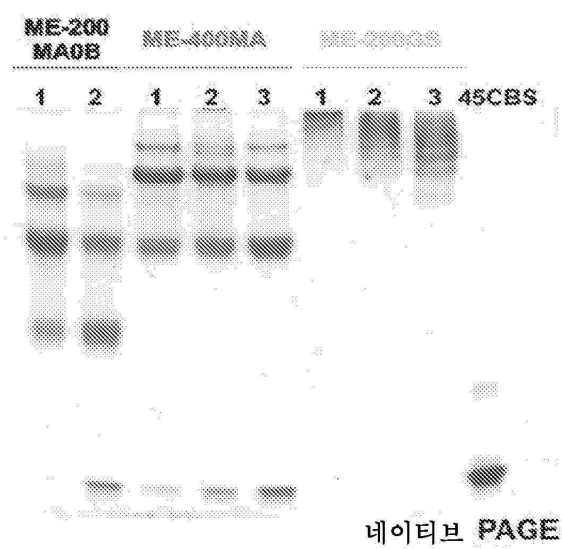
도면8b



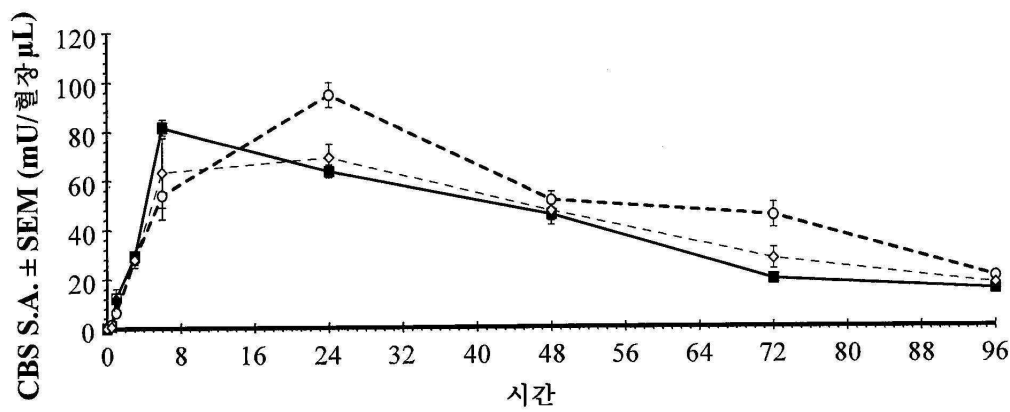
도면9a



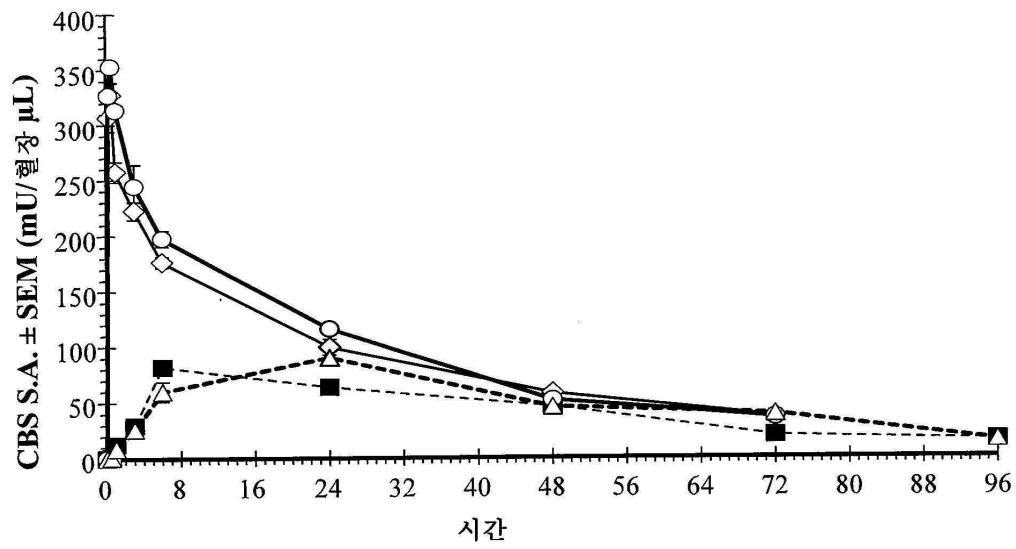
도면9b



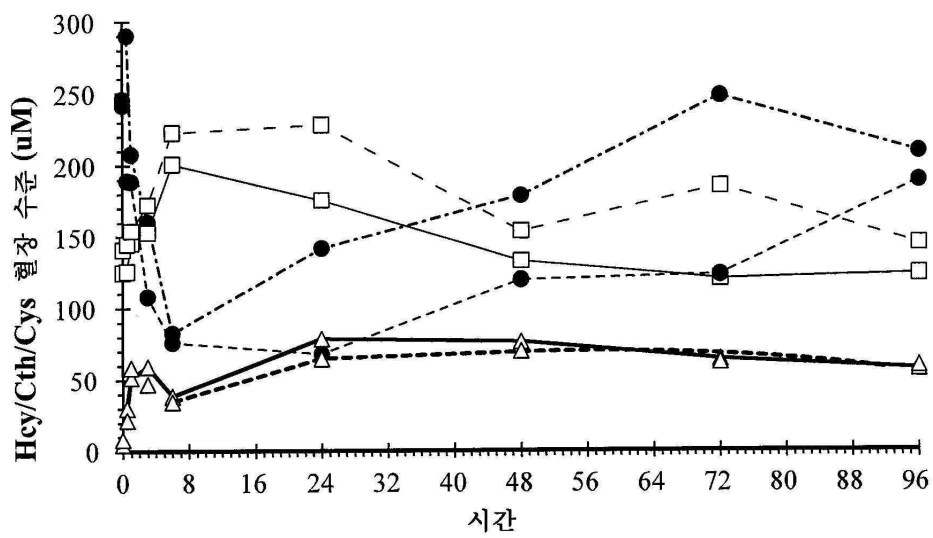
도면10a



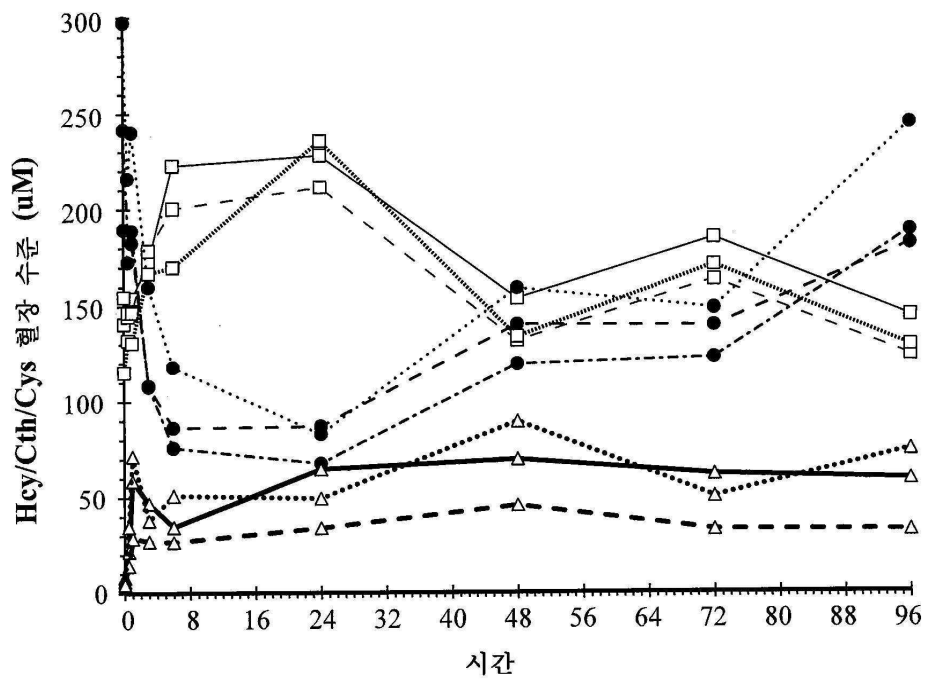
도면10b



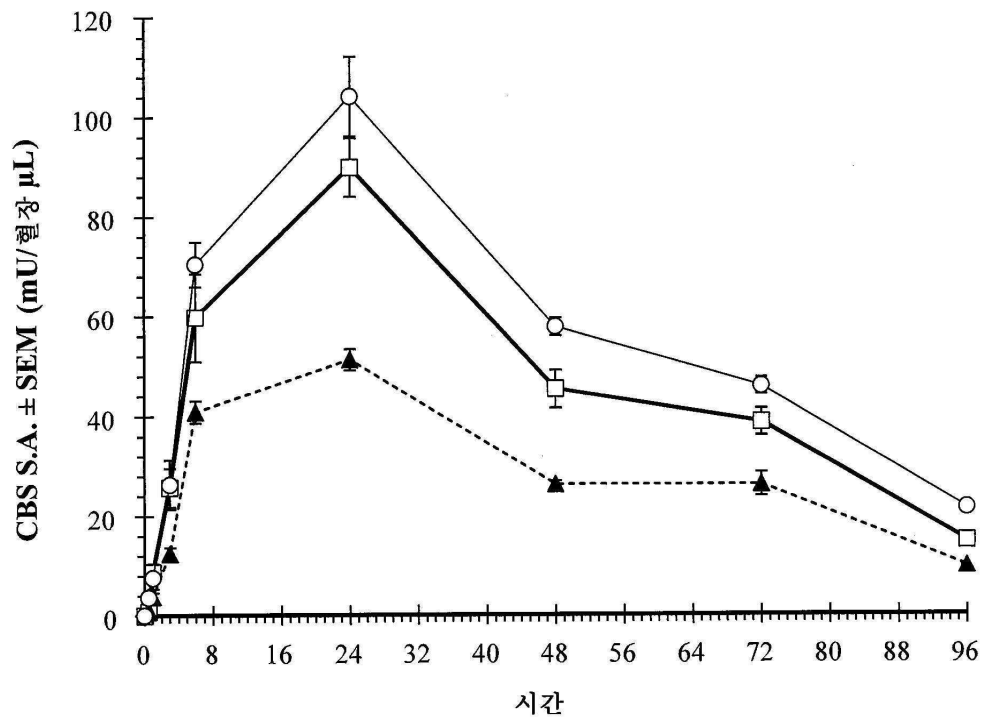
도면10c



도면10d

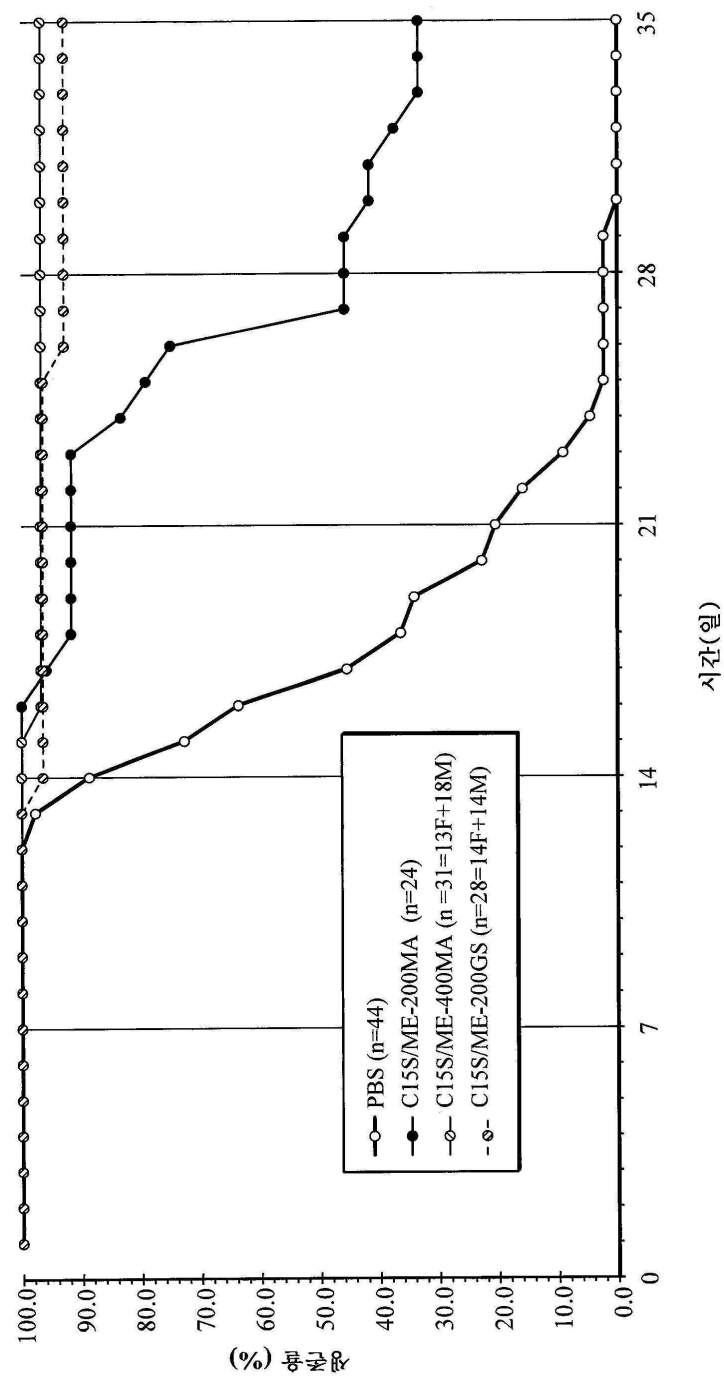


도면10e

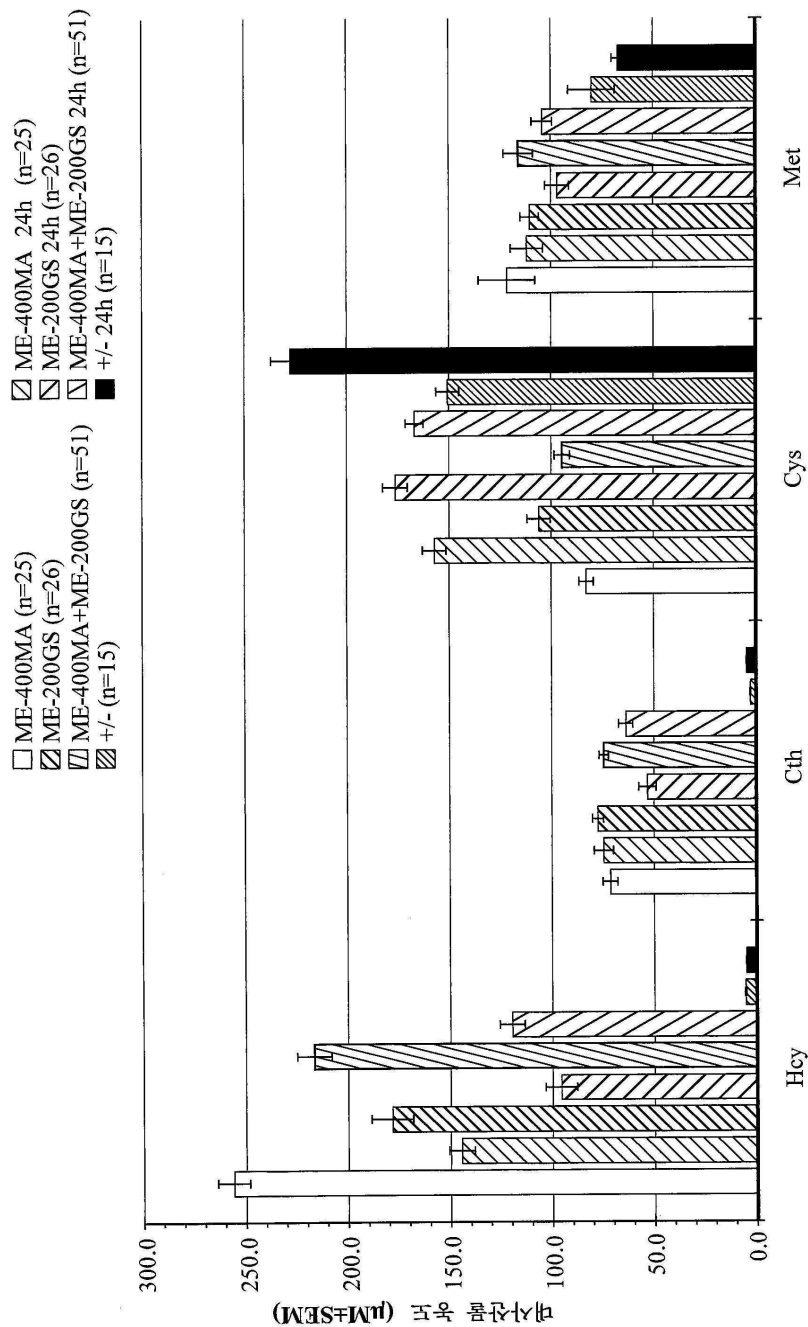




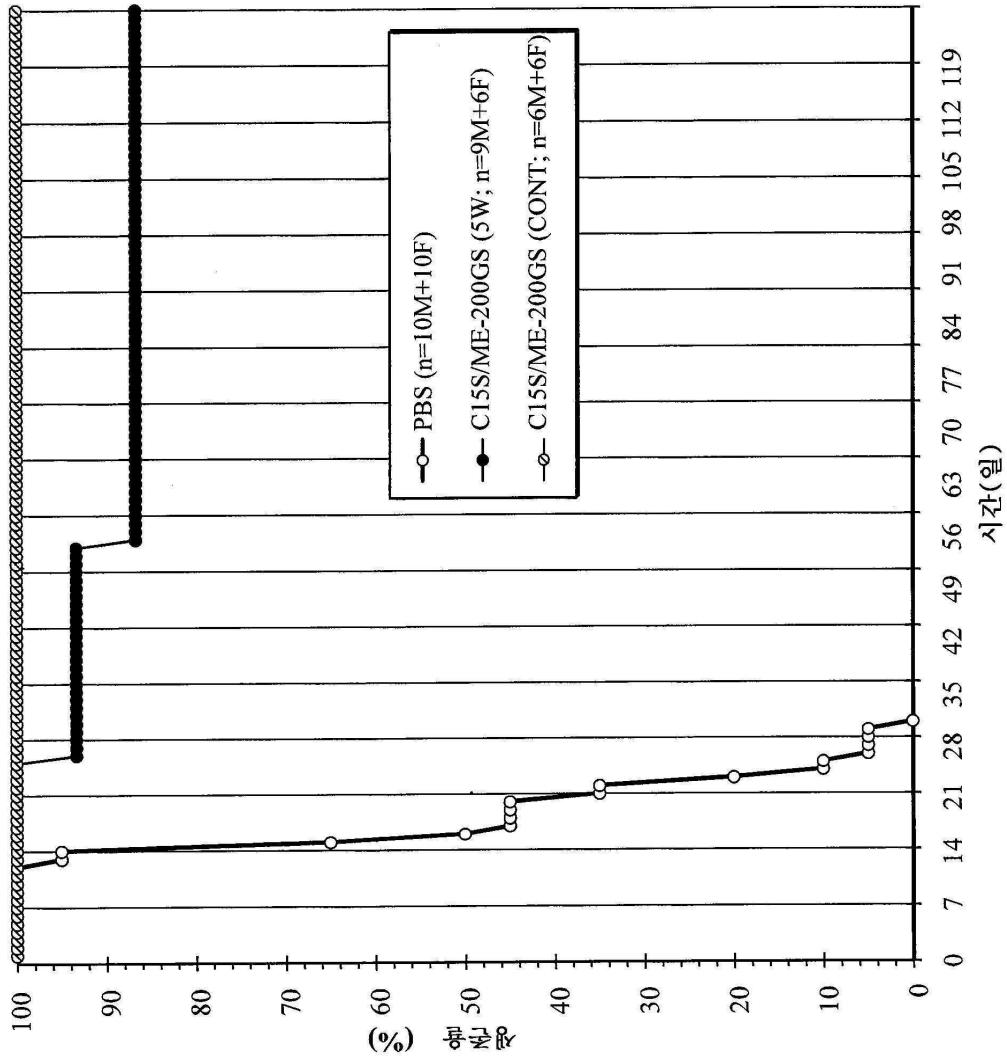
도면11a



도면11b



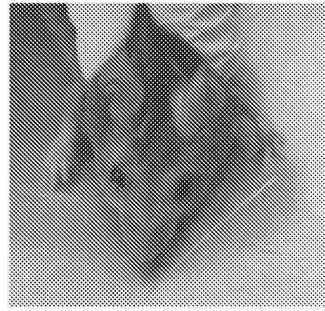
도면11c



도면12a



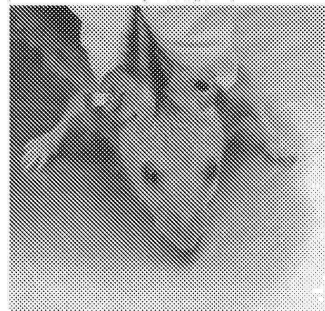
1739M (-/-)  
6W 처리 그룹  
(4M)



1739M (-/-)  
6W 처리 그룹  
(7M)



1739M (-/-)  
6W 처리 그룹  
(9.5M)



1848M (-/-)  
이환된 대조군  
(7M)

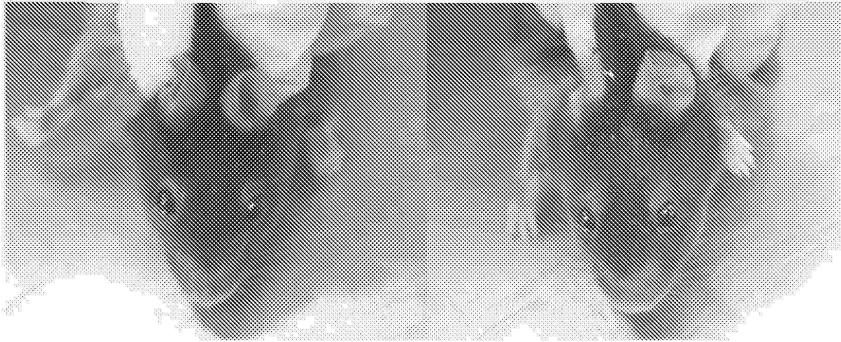


1737M (+/-)  
건강한 대조군  
(9.5M)

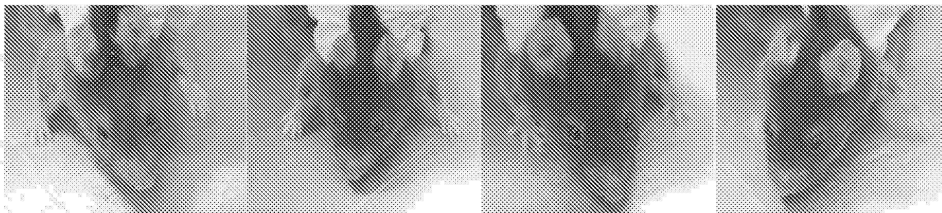


도면12b

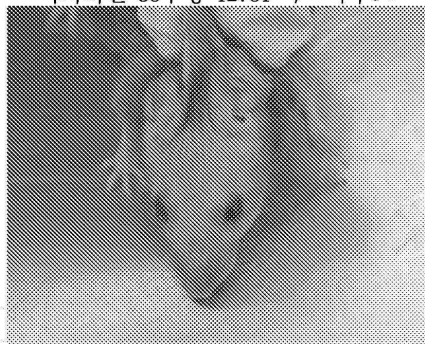
미처리된 19주령 및 34주령 I278T +/- 마우스



4주령부터 PEG htCBS(20MA)로 연속적으로 처리된 19주령, 24주령, 31주령 및 35주령 I278T -/- 마우스

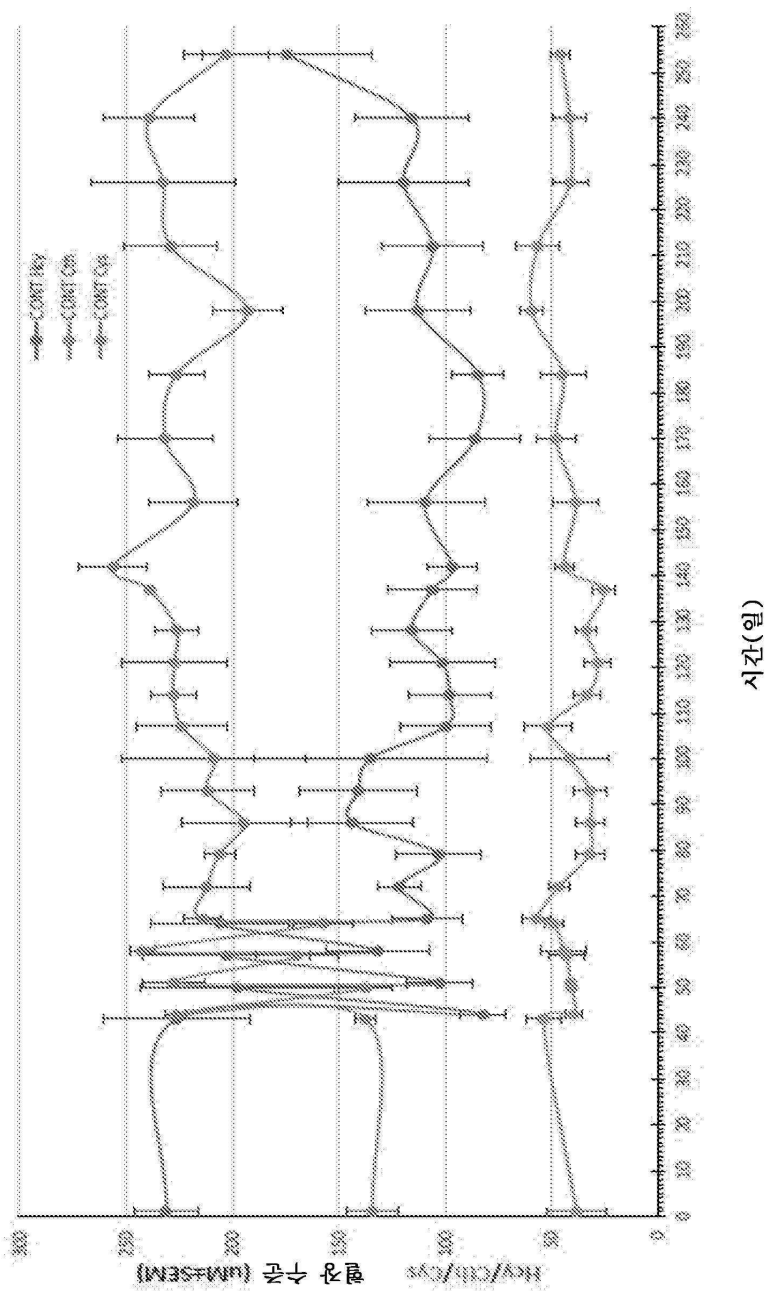


미처리된 38주령 I278T -/- 마우스



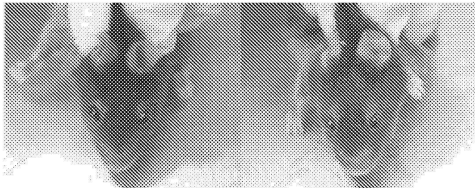


도면12c

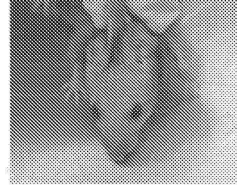


도면12d

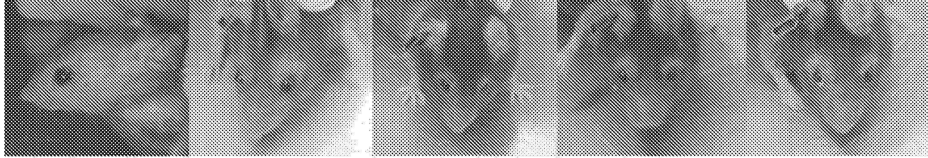
미처리된 19주령 및 34주령 I278T +/- 마우스



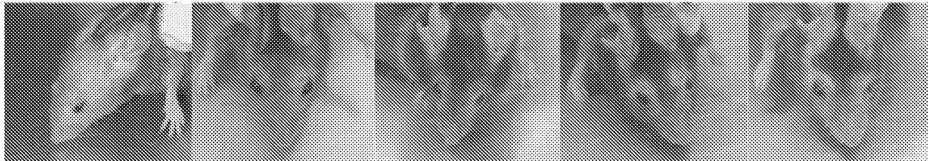
미처리된 38주령의 I278T -/- 마우스



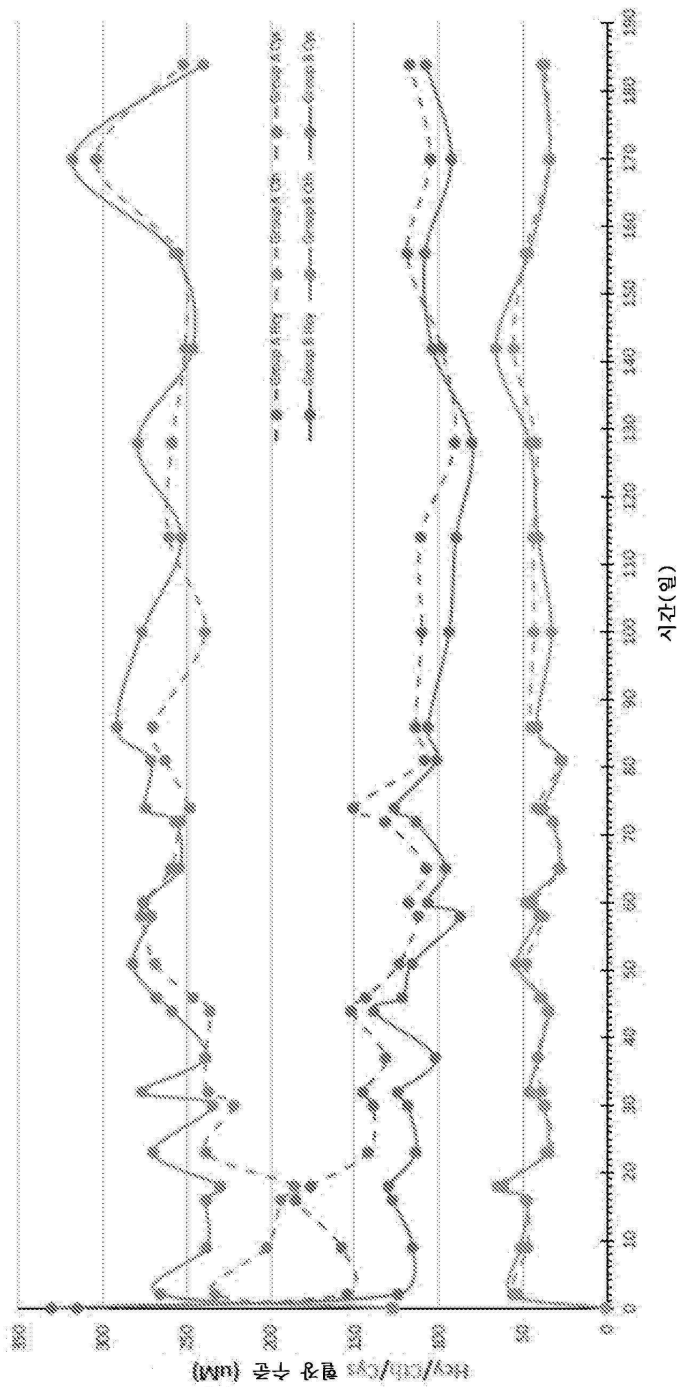
약 6개월령(전체 안면 탈모증)부터 약 6개월 동안 PEG htCBS(20NHs)로 처리된 27주령, 32주령, 37주령, 44주령 및 50주령 I278T -/- 마우스



약 6개월령(전체 안면 탈모증)부터 약 6개월 동안 PEG htCBS(40MA)로 처리된 27주령, 32주령, 37주령, 44주령 및 50주령 I278T -/- 마우스

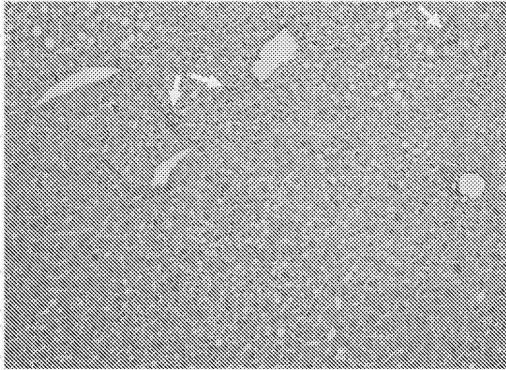


도면12e

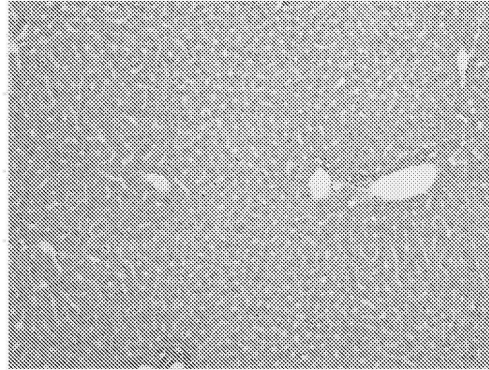


도면13a

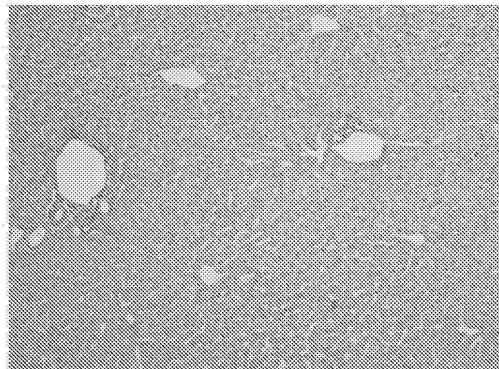
PBS 주사된 K01982(-/-)  
중등도 내지 중증 간병증



20NHS C15S/ME-200GS 주사된 K02276(-/-)  
경미한 변화



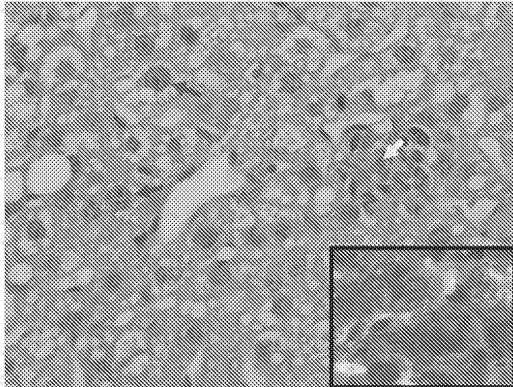
K01985(+/-) 건강한 대조군  
최소의 변화



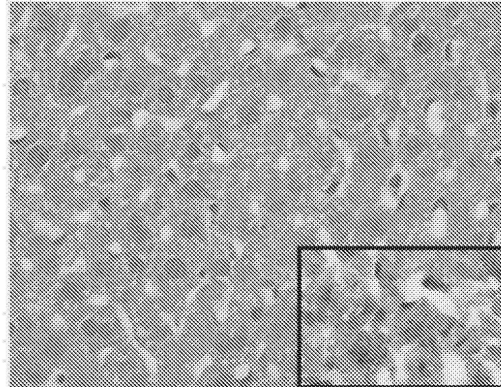


도면13b

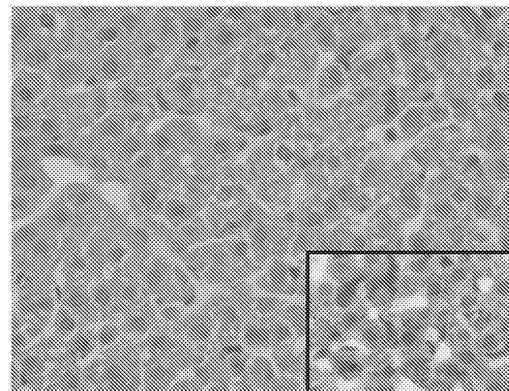
PBS 주사된 K01982(-/-)  
중등도 내지 중증 간병증



20NHS PEG-CBS 주사된 K02276(-/-)  
경미한 변화

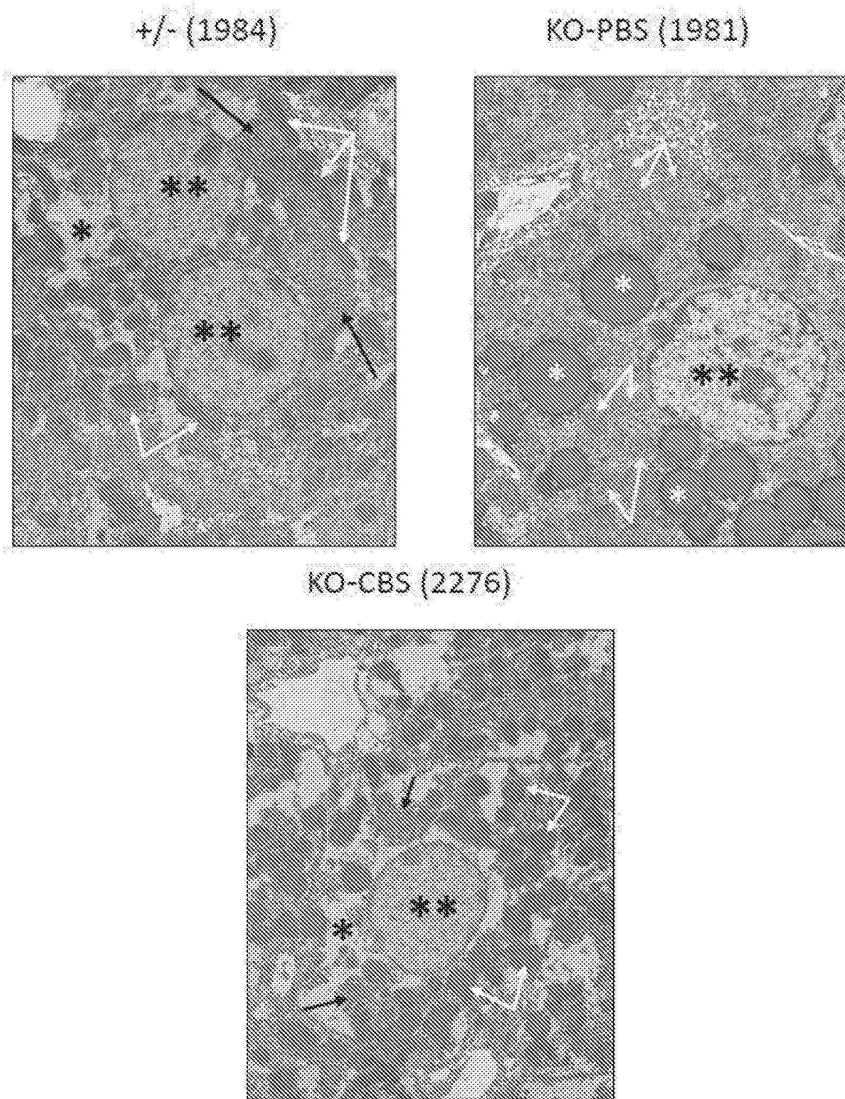


K01985(+/-) 건강한 대조군  
최소의 변화

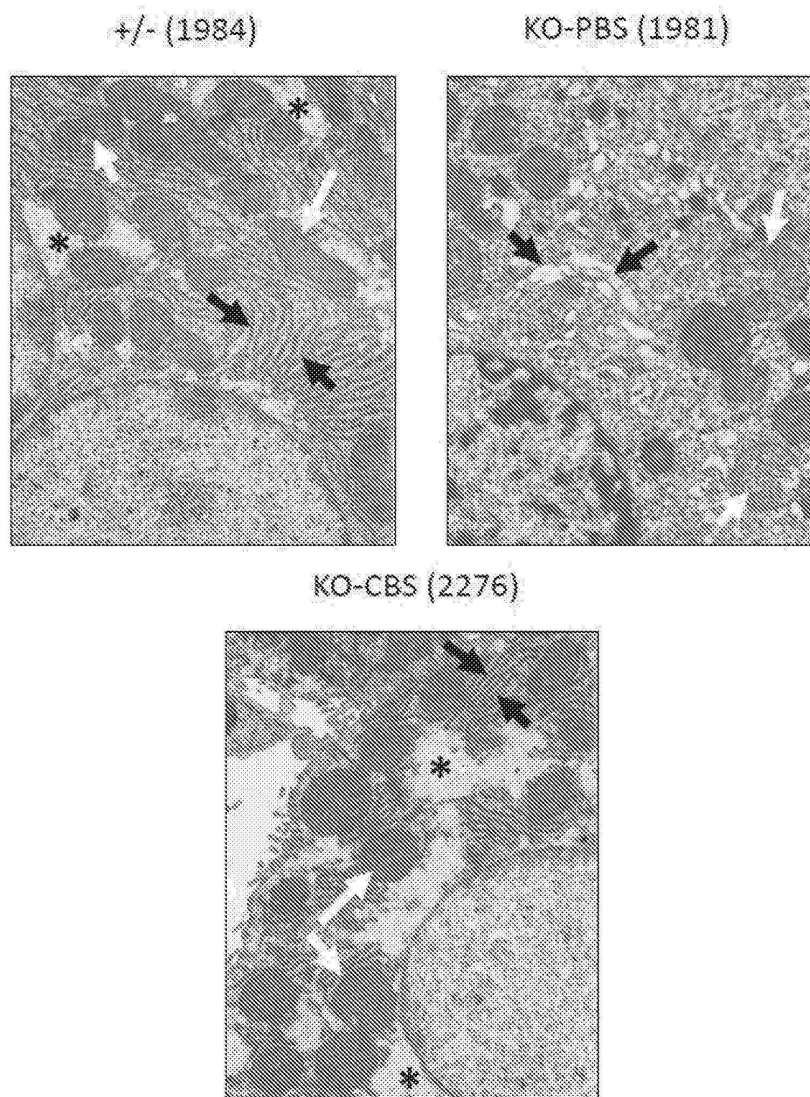




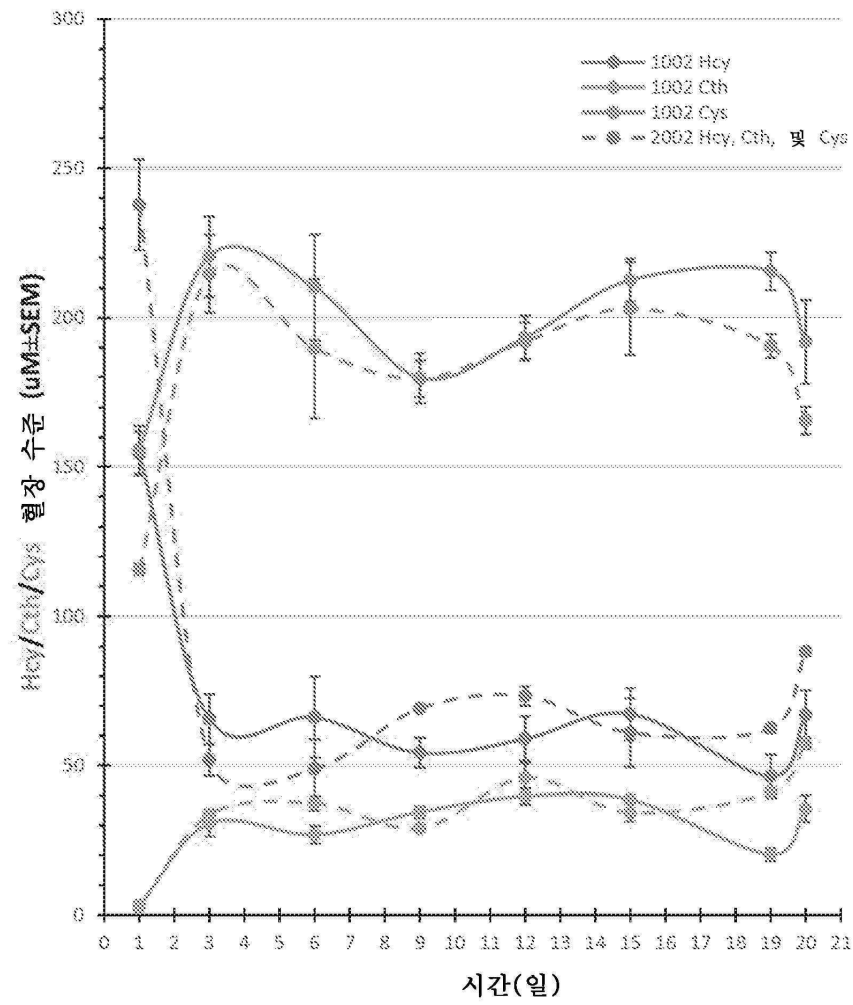
도면14a



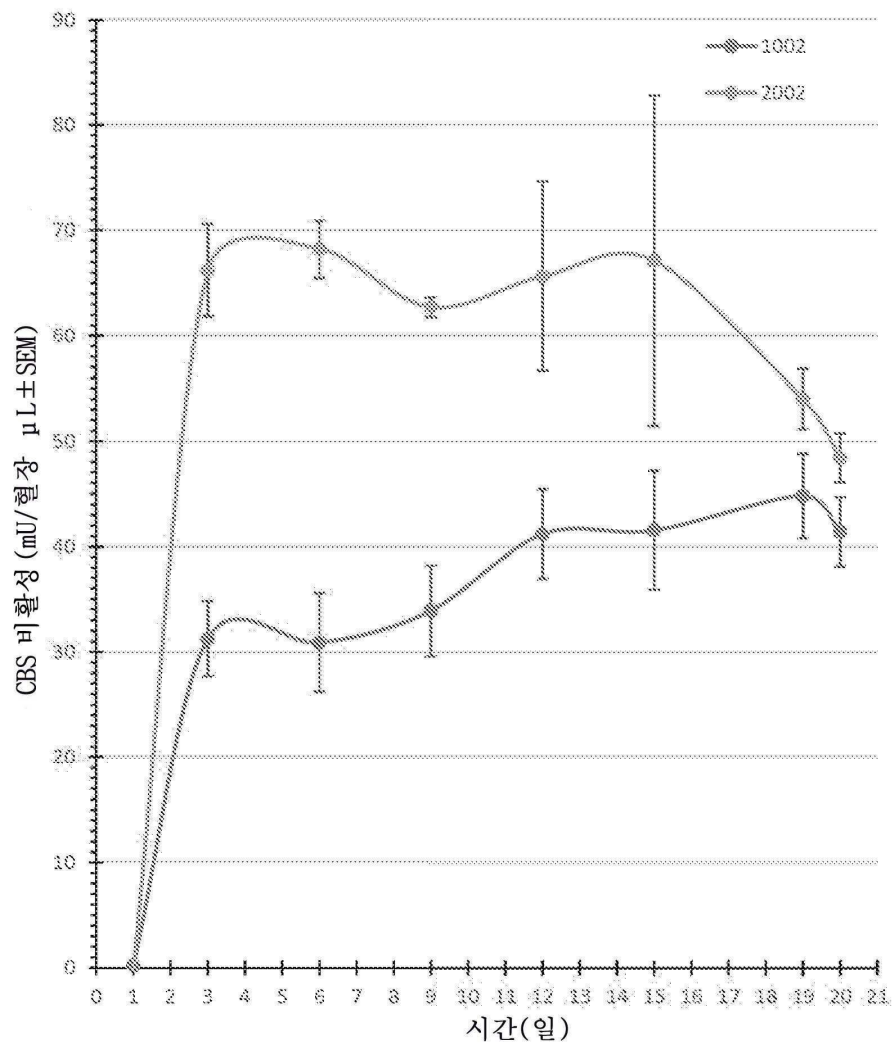
도면14b



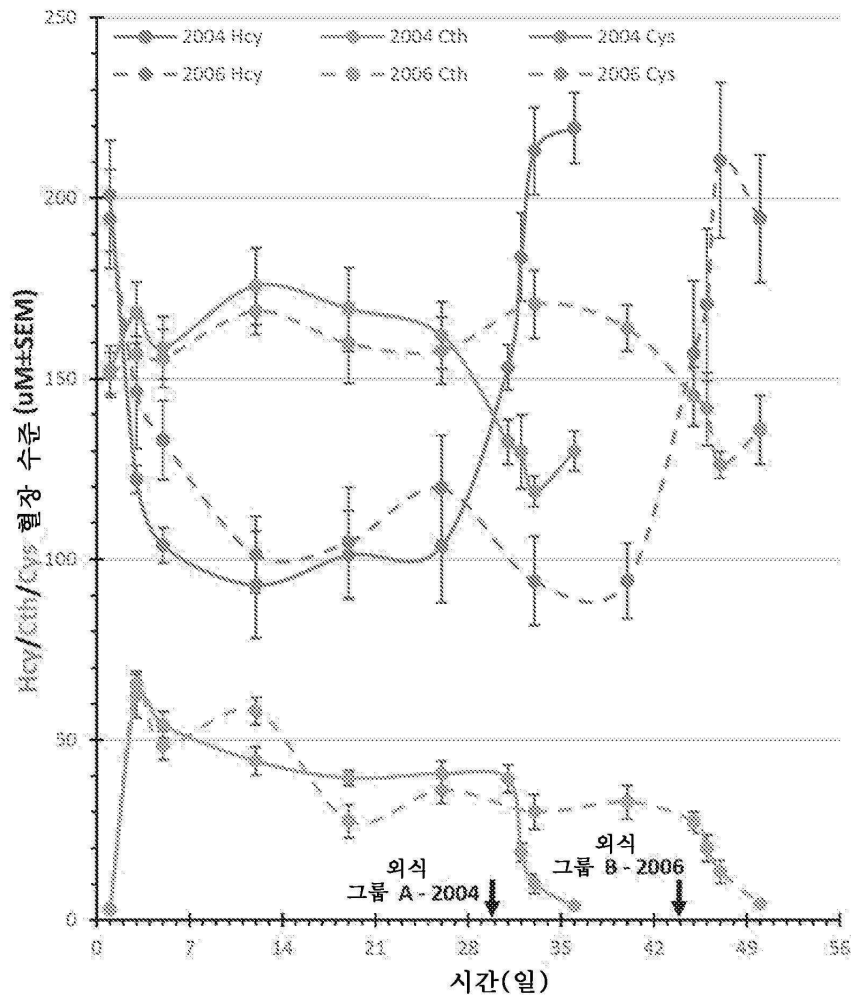
도면15a



도면15b

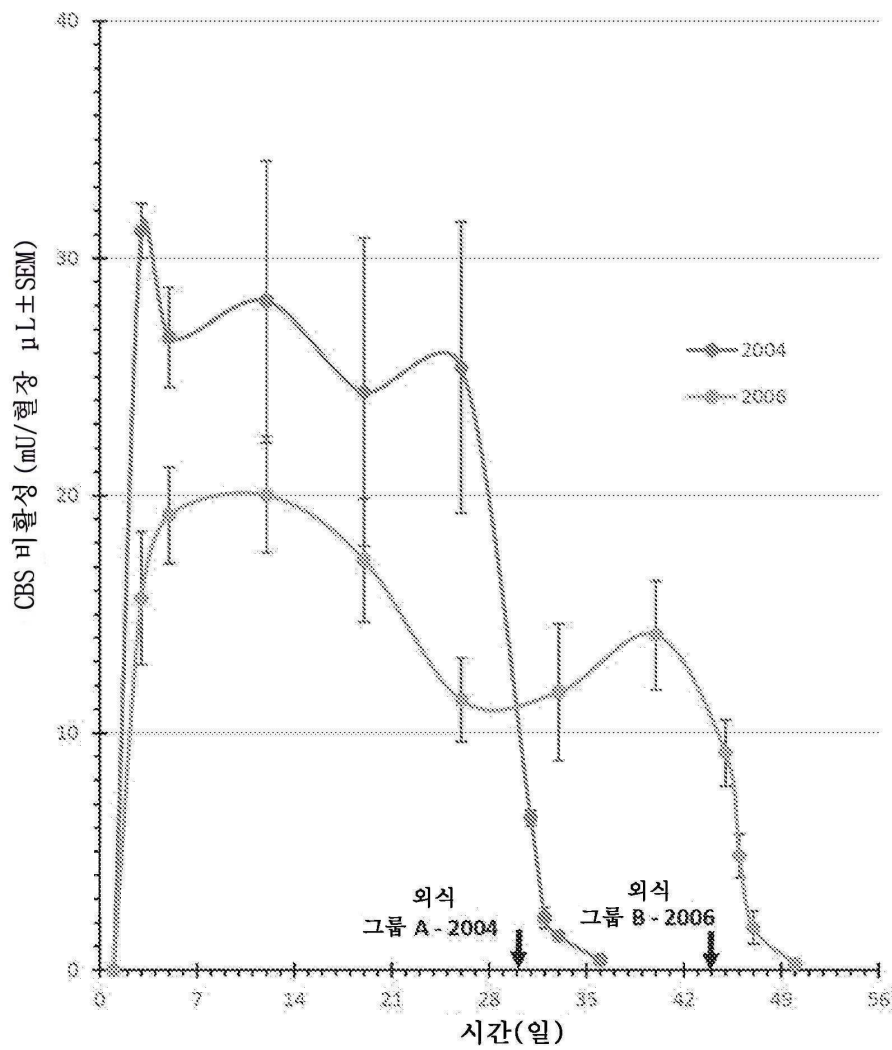


도면15c

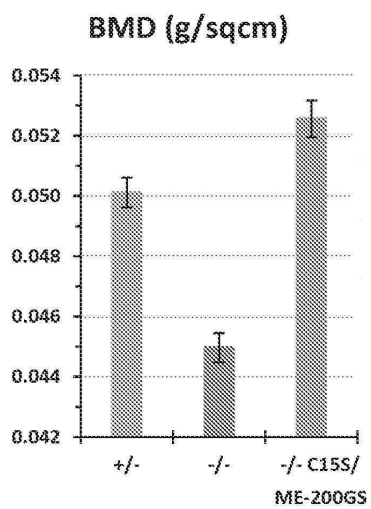




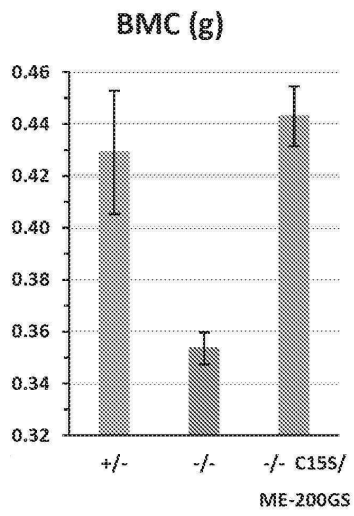
도면15d



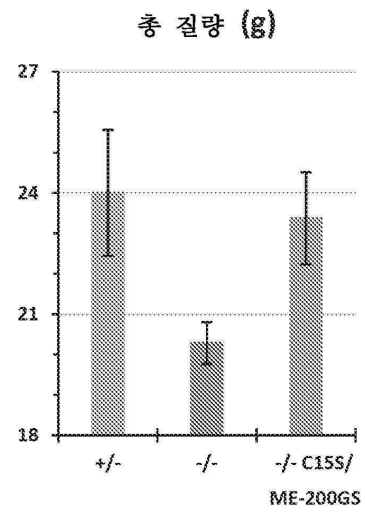
도면16a



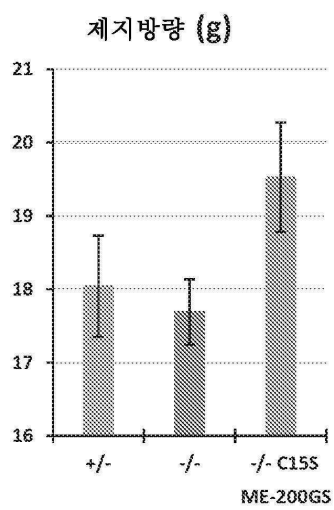
도면16b



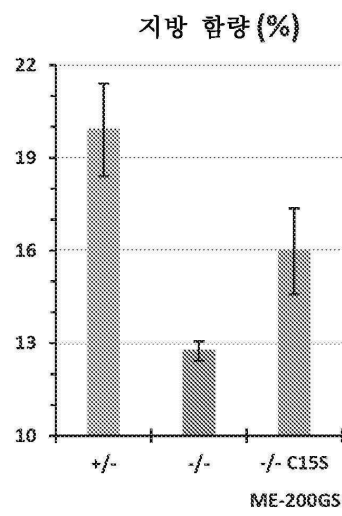
도면16c



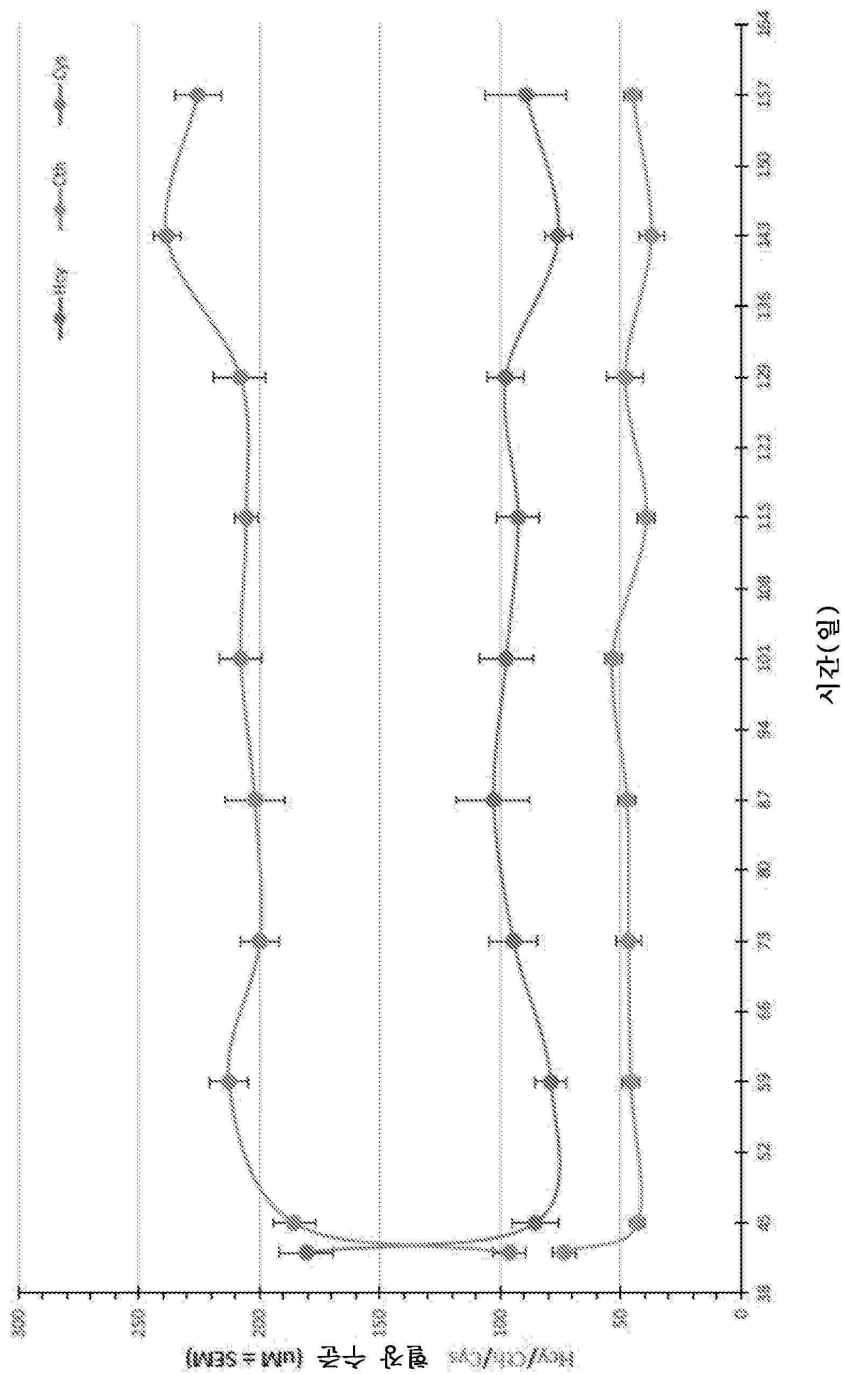
도면16d



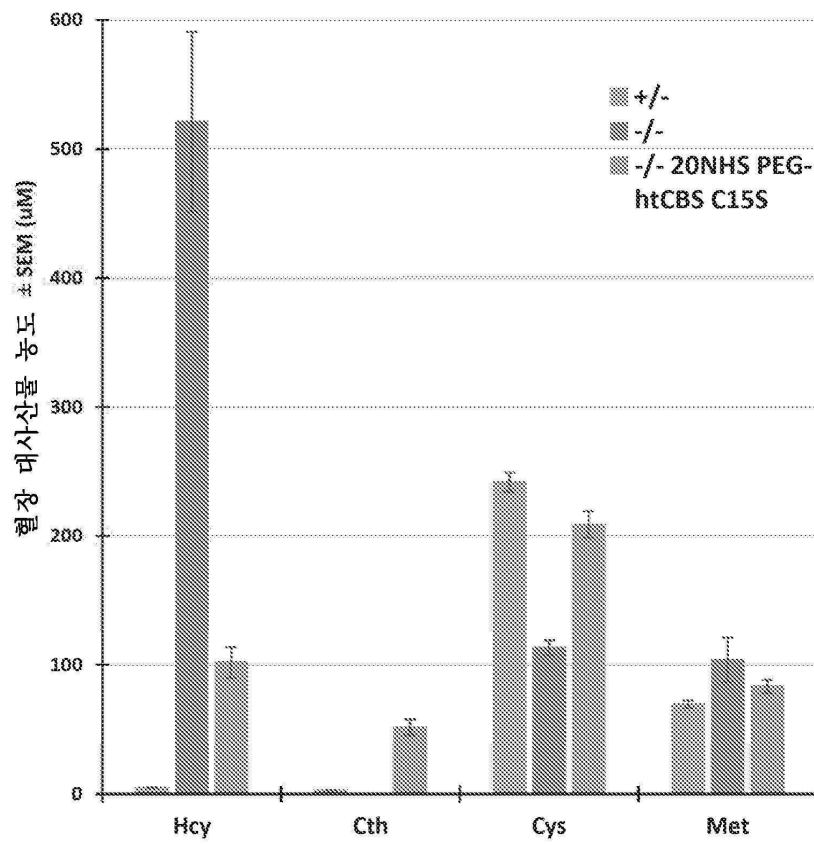
도면16e



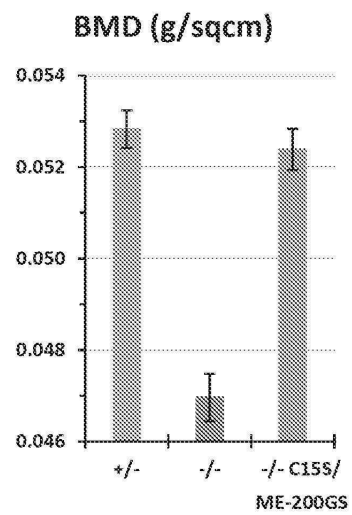
도면16f



도면16g

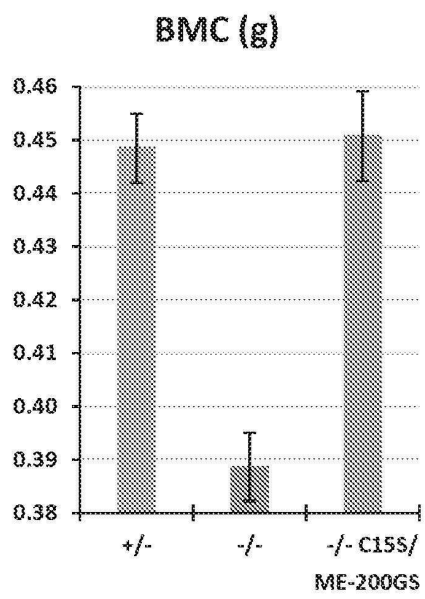


도면17a

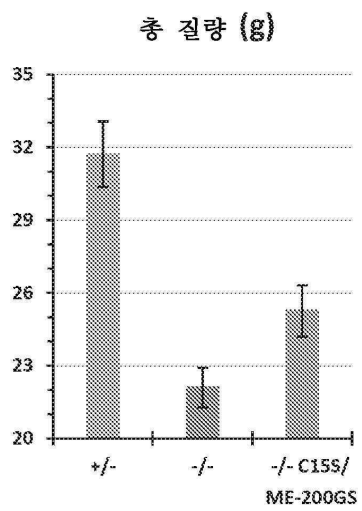




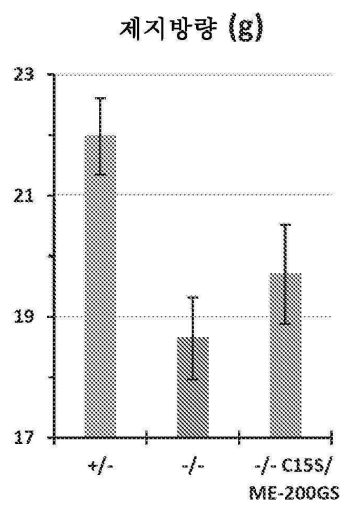
도면17b



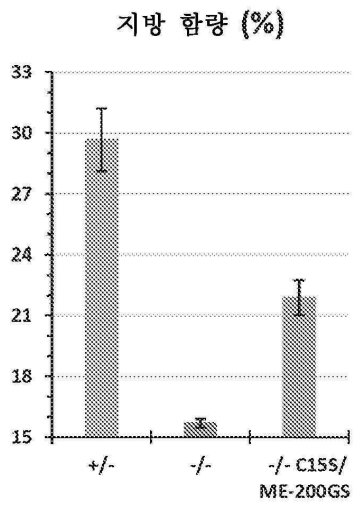
도면17c



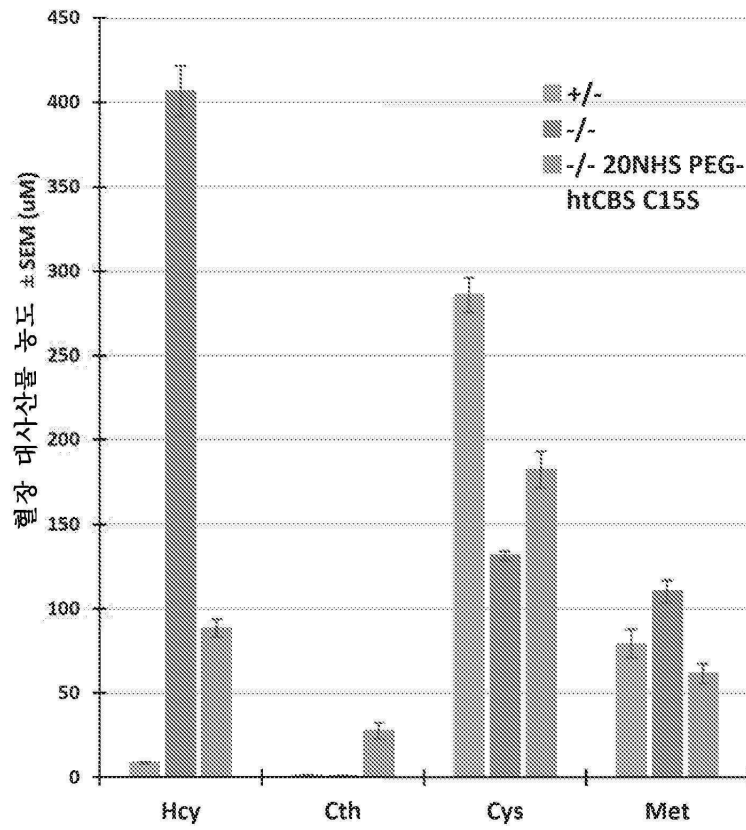
도면17d



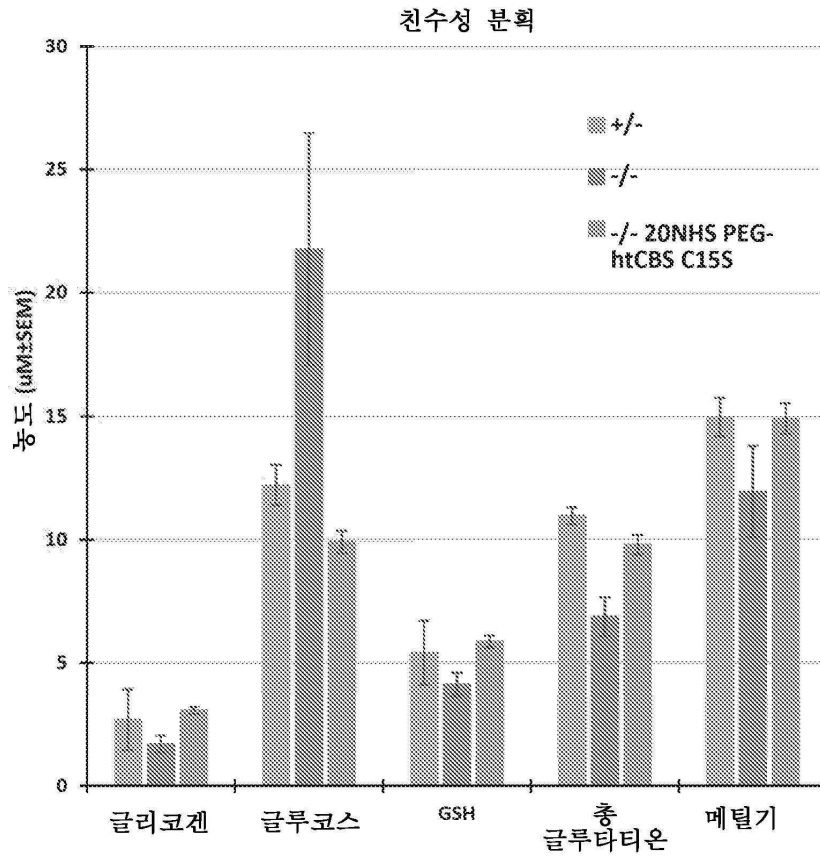
도면17e



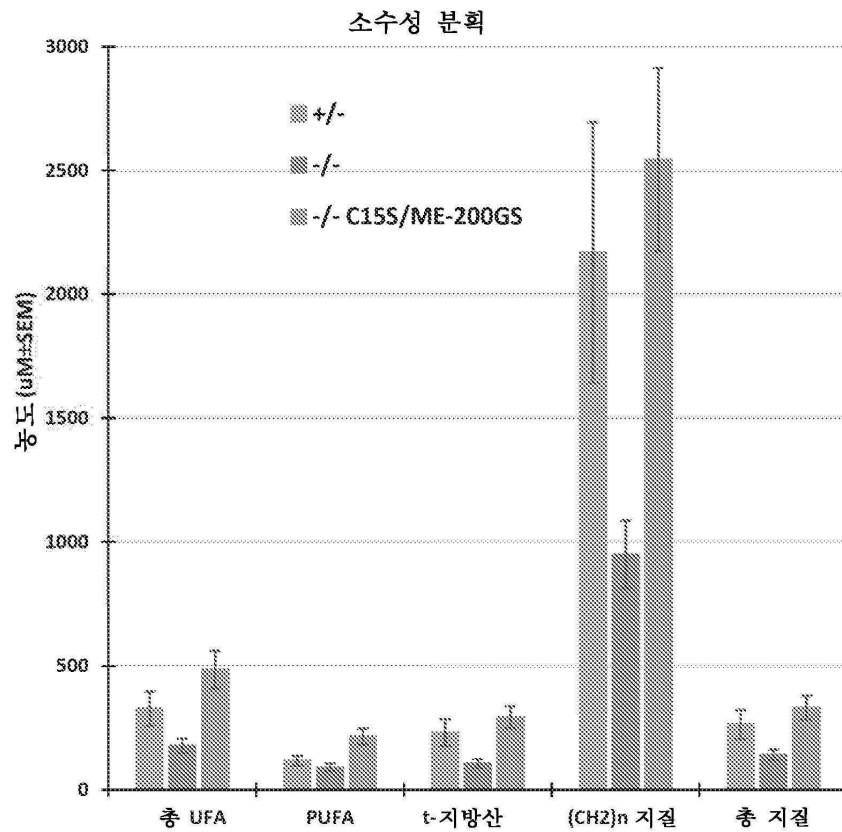
도면17f



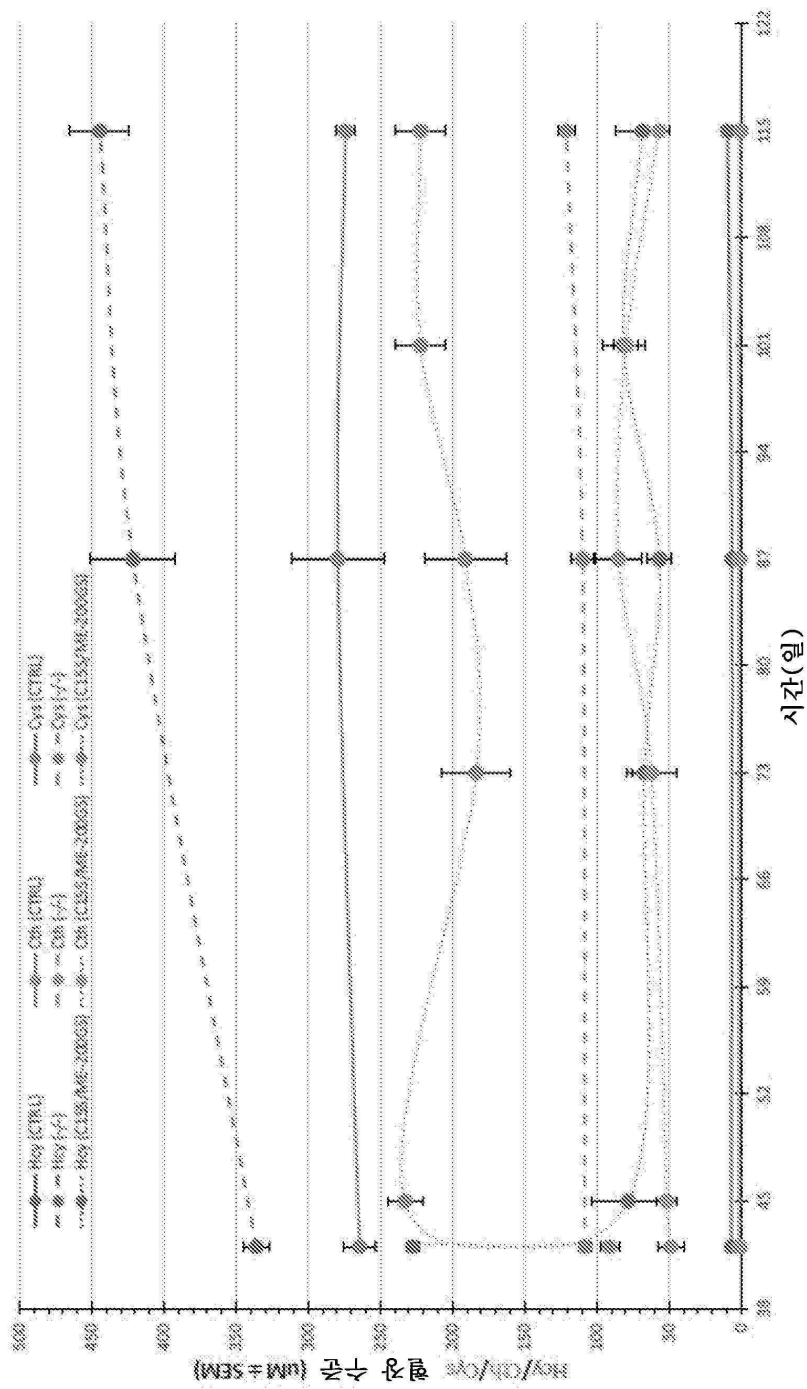
도면18a



도면18b

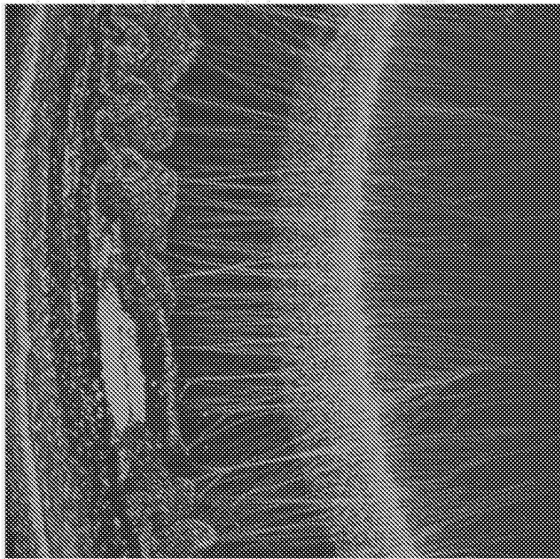


도면 19a

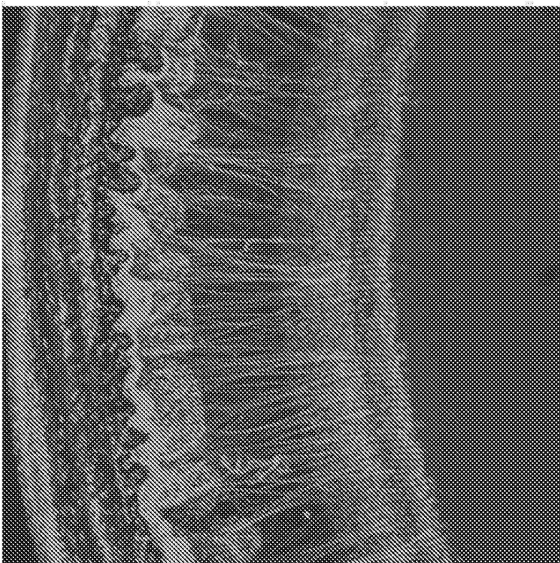




도면19b



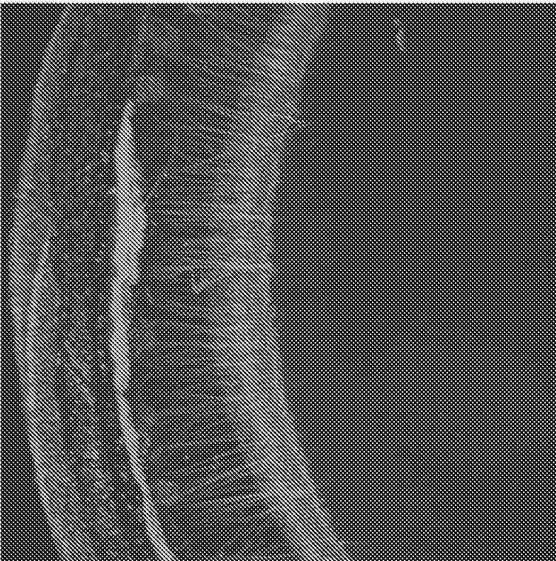
도면19c



도면19d

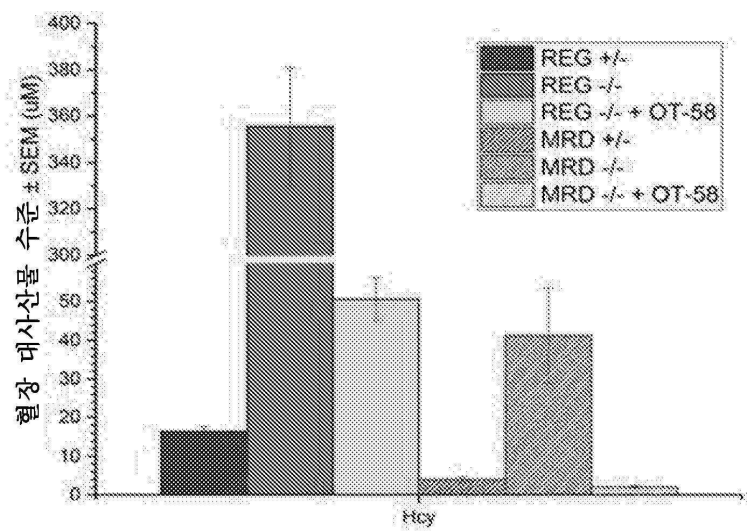


도면19e

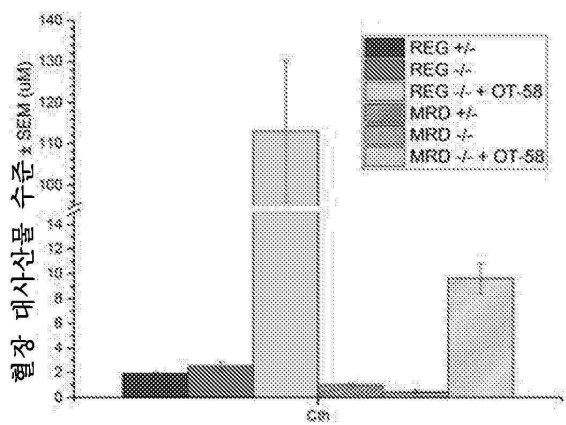




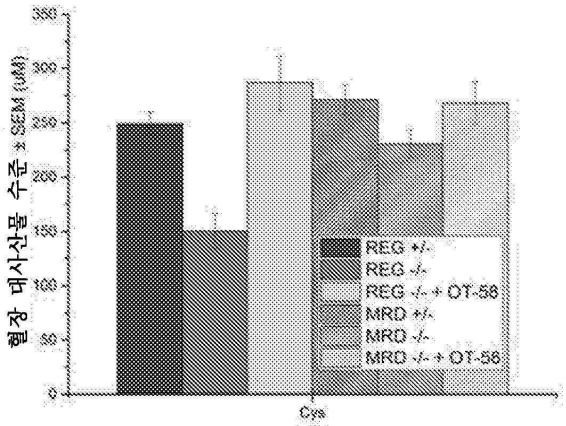
도면20a



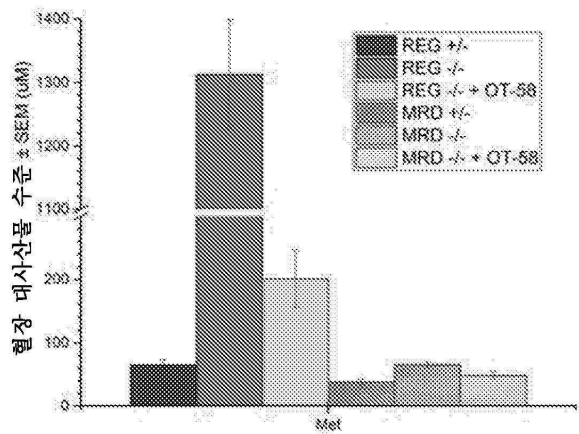
도면20b



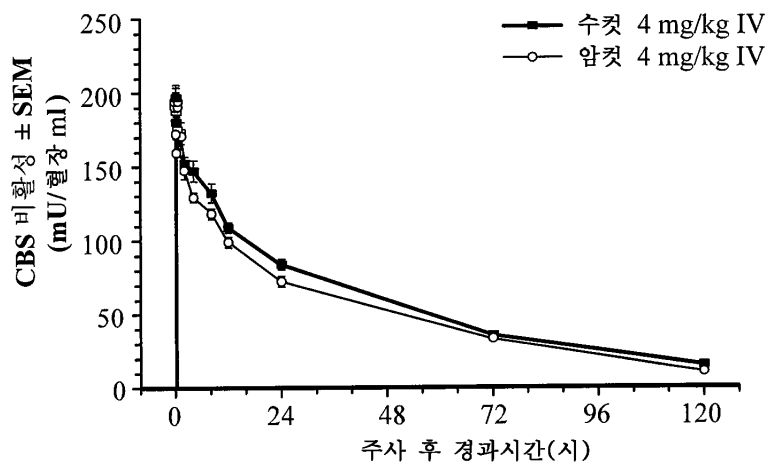
도면20c



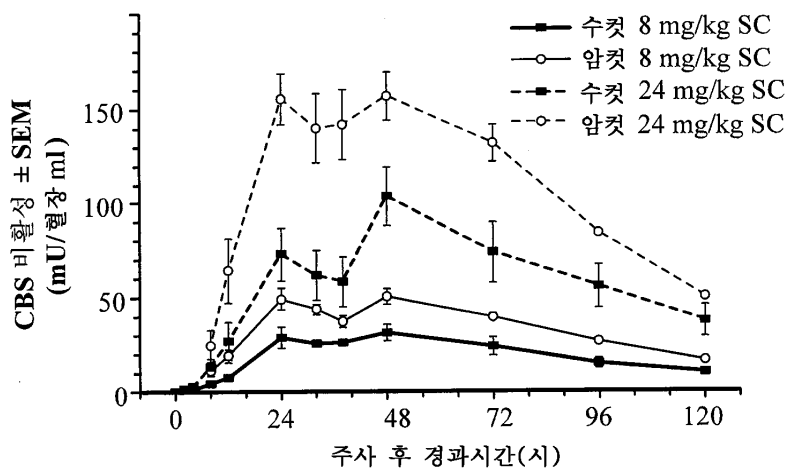
도면20d



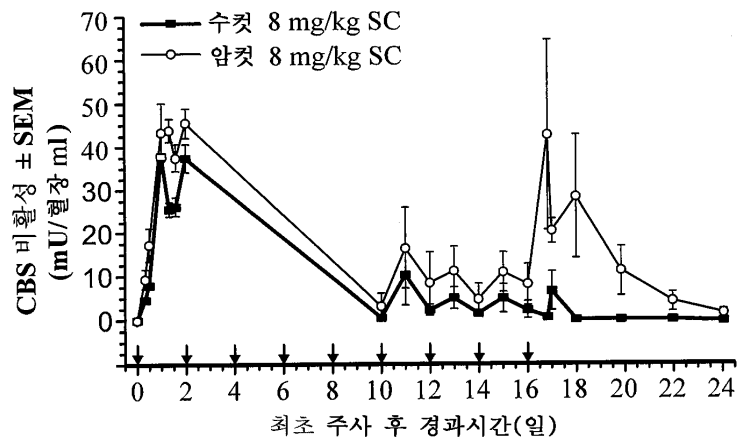
도면21a



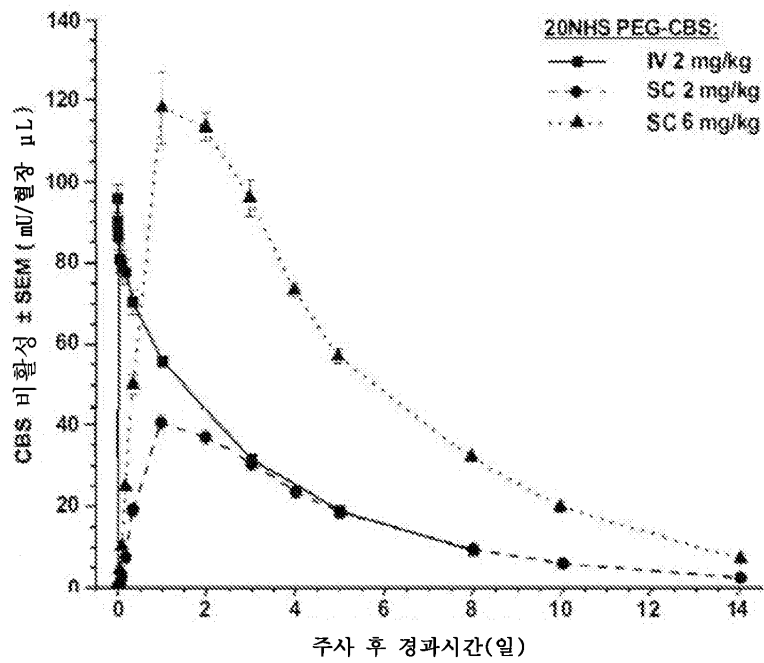
도면21b



도면21c

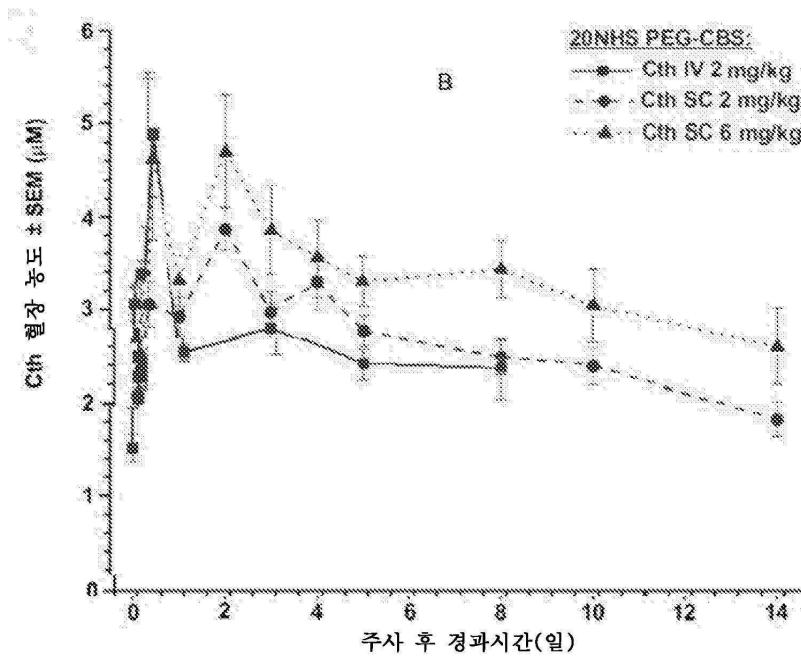


도면22a

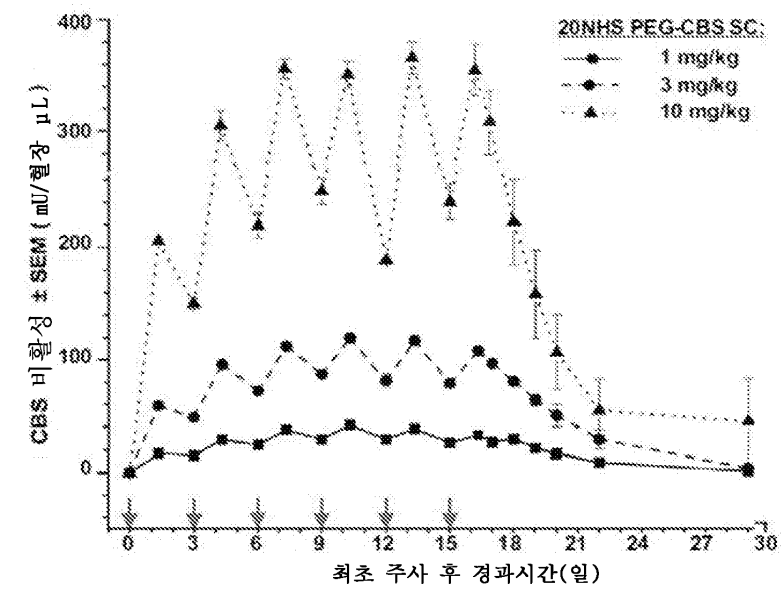




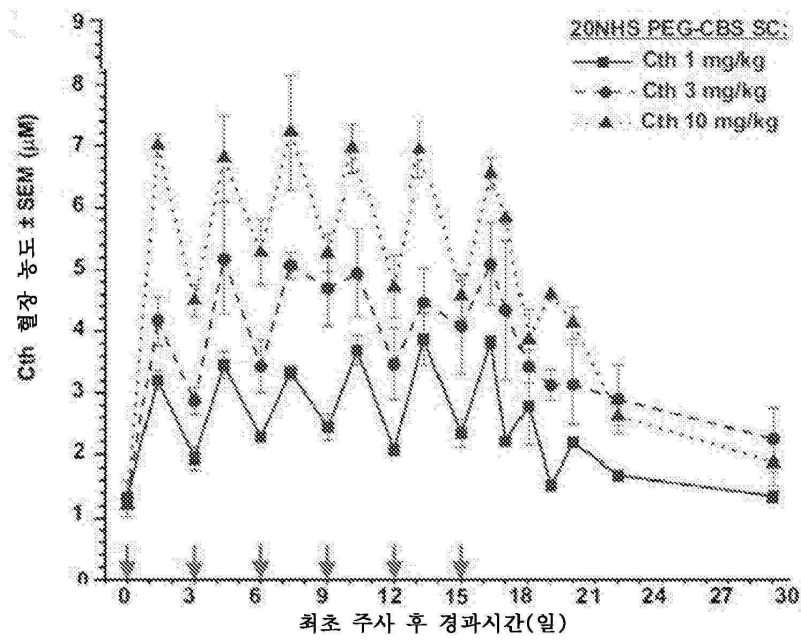
도면22b



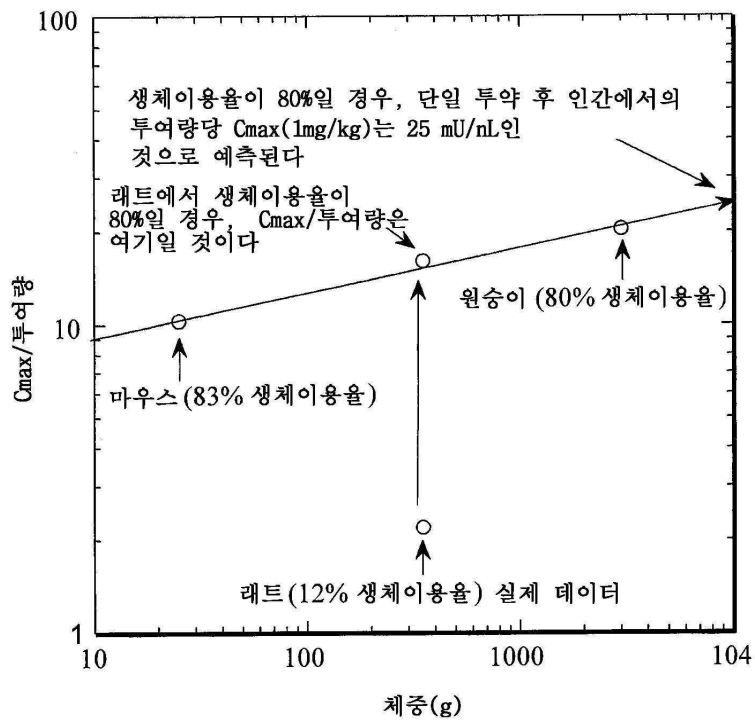
도면23a



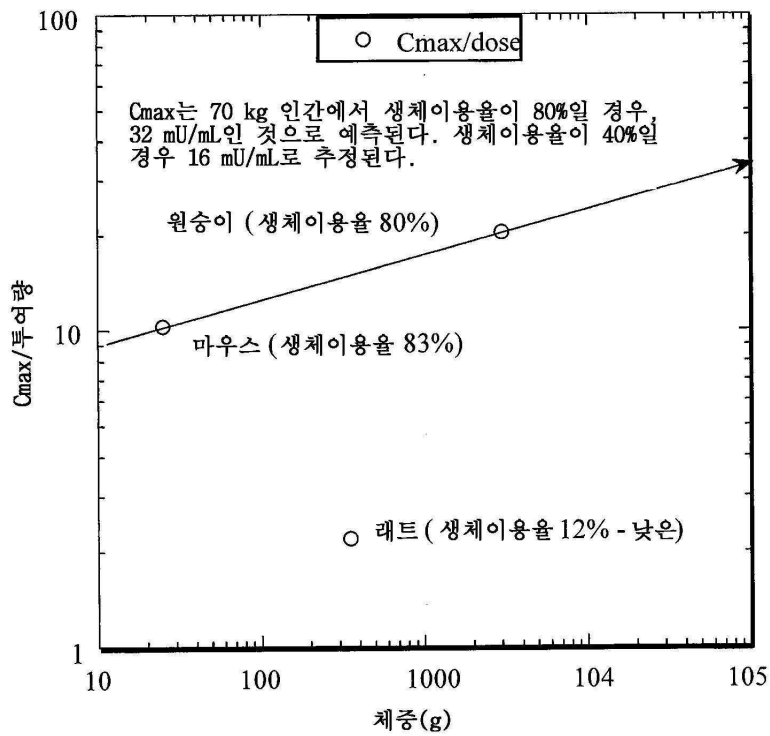
도면23b



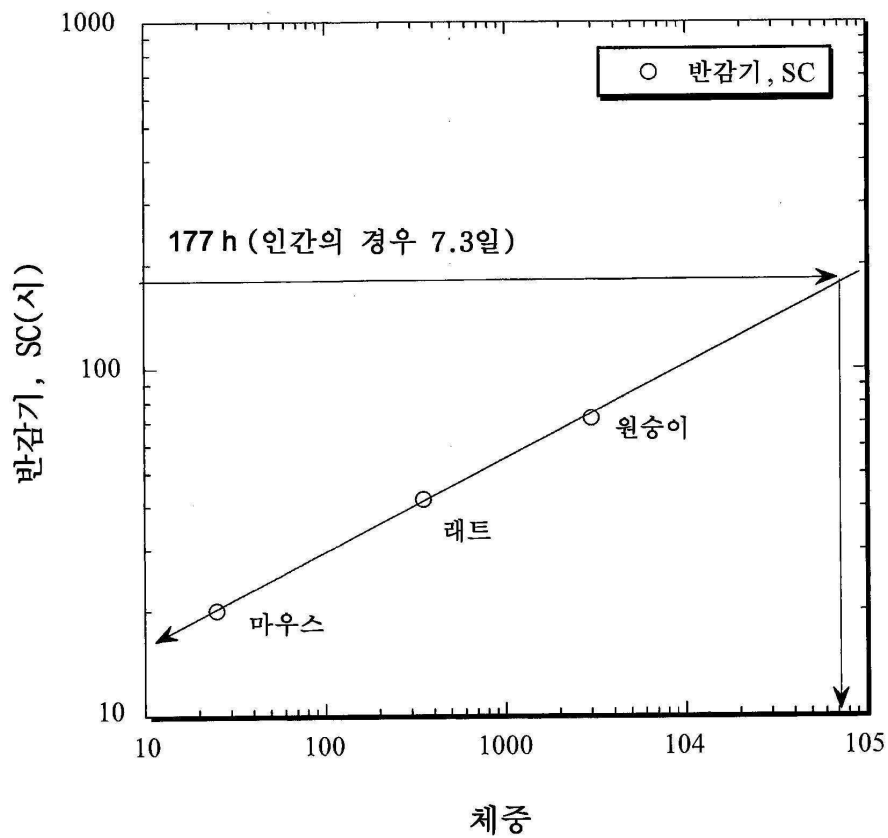
도면24a



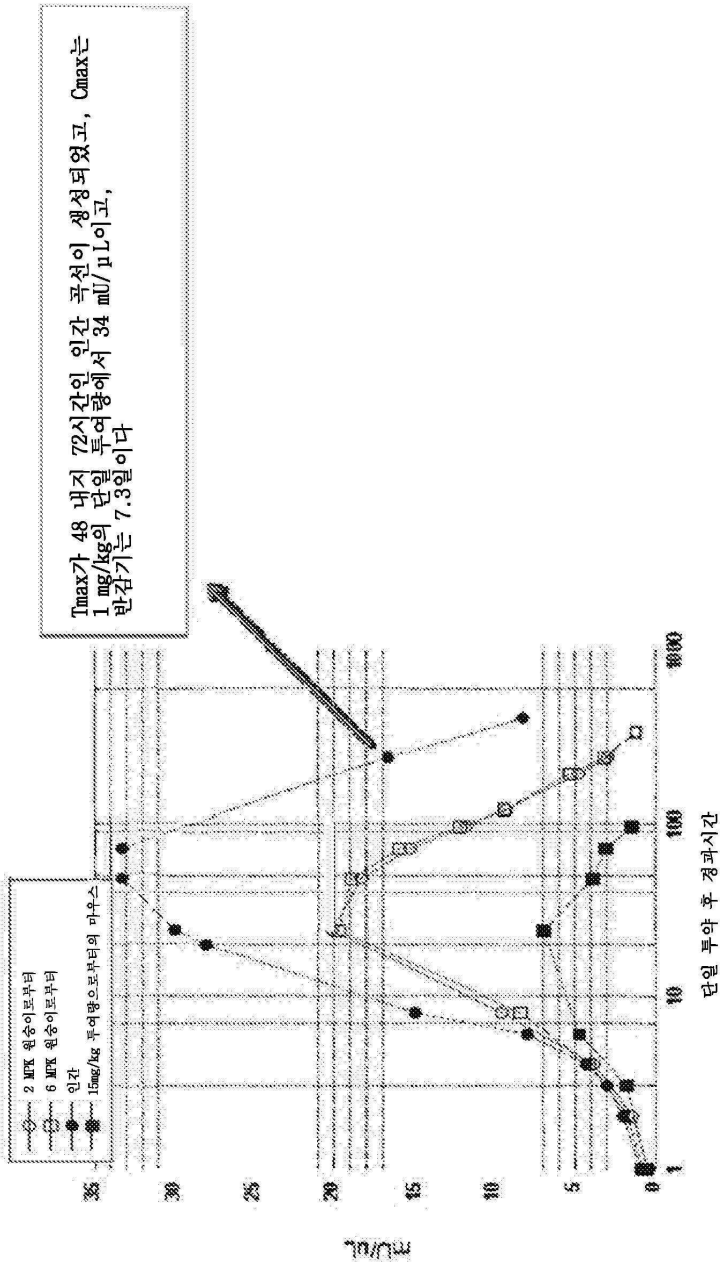
도면24b



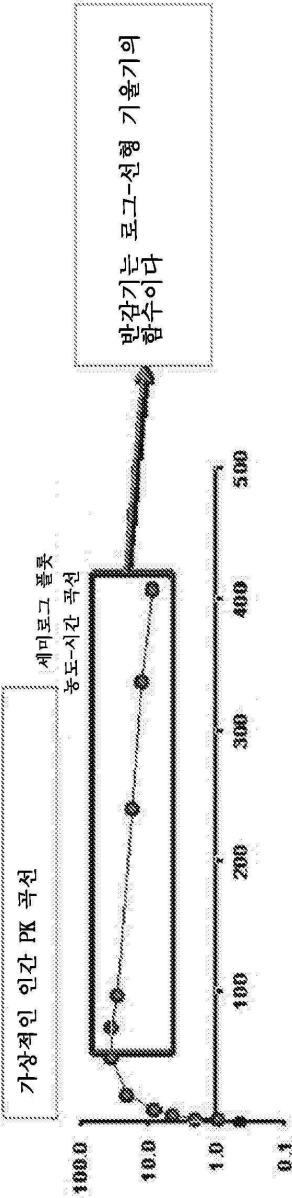
도면24c



도면24d

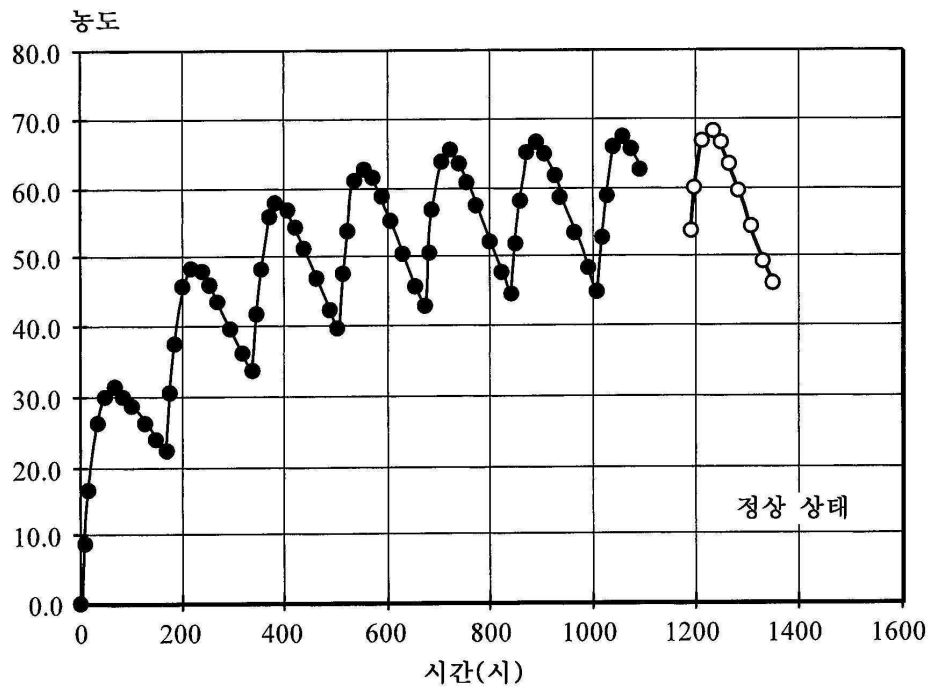


도면24e

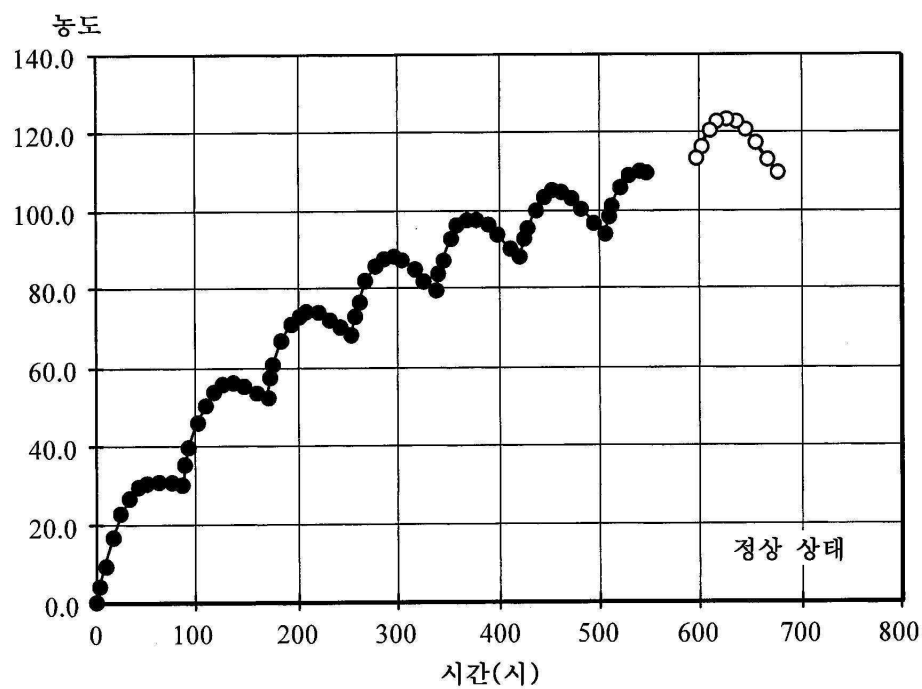




도면24f



도면24g



### 서열 목록

#### SEQUENCE LISTING

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, A BODY CORPORATE

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT OF HOMOCYSTEINURIA

<130> 2089.1003PCT2  
 <150> US 14/935,690  
 <151> 2015-11-09  
 <160> 16  
 <170> KopatentIn 1.71  
 <210> 1  
 <211> 1656  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

```

atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gttccccgca ccgtagcgg      60
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa      120
ccgctgtgga ttcgtccgga cgcaccgtca cgctgtacct ggcagctggg tcgtccggca      180

agcgaatctc cgcatcacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatata      240
ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatgggt cgtatcaaca aaatcggcaa aaaattcgg      300
ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcgggttc cgtgaaagat      360
cgtatctcac tgcgcatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcaccctgaa accgggtgat      420
acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggcggcagtc      480
cgtgggtatc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc      540
ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttcgt accccgacga atgcccgctt cgacagtccg      600

gaatcccatg tgggtgttgc atggcgctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg      660
gatcagtatc gtaacgctag caatccgtg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc      720
ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggtcgctt ctgtgggtac cggcggtaac      780
attacgggca tcgcgcgtaa actgaaagaa aaatgcccg gctgtcgcat tatcgggtgtg      840
gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg      900
tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tcctggatcg cacggtggtt      960
gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct      1020

caggaaggtc tgctgtgcgg tggttcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaaagct      1080
gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtcgtgattc tgccggattc tgttcgcaac      1140
tacatgacca aatttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggttcct gaaagaagaa      1200
gatctgaccg agaaaaaacc gtgggtgggtg cacctgcgcg tgcaggaact gggctctgtcc      1260
gcaccgtgta ccgttctgcc gaccatcacg tgcggccata cgattgaaat cctgcgtgaa      1320
    
```

```

aaaggttttg atcaggcccc ggttgtcgac gaagcaggcg tgattctggg tatggttacc 1380
ctgggtaaca tgctgagttc cctgctggcg ggcaaagtgc aaccgagcga tcaggttggt 1440

aaagtcatct acaacaatt caaacagatt cgtctgaccg atacgtctgg cgcctgtcg 1500
cacatcctgg aaatggacca ttctgcgtcg gttgtgcacg aacagattca ataccatagc 1560
accggcaaat catcgcagcg ccaaattggtc ttgggtgtcg tgacggccat tgatctgctg 1620
aatctcgtgg ccgcacaaga acgtgaccag aaataa 1656

<210> 2
<211> 551
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
1          5          10          15
His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser

          20          25          30
Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
          35          40          45
Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
          50          55          60
His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65          70          75          80
Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly

          85          90          95
Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe
          100          105          110
Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu
          115          120          125
Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu
          130          135          140
Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val

145          150          155          160

```

Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu  
 165 170 175  
 Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro  
 180 185 190  
 Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp  
 195 200 205  
 Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg  
 210 215 220  
 Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile  
 225 230 235 240  
 Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly  
 245 250 255  
 Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys  
 260 265 270  
 Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala  
 275 280 285  
 Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu  
 290 295 300  
 Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val  
 305 310 315 320  
 Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg  
 325 330 335  
 Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser  
 340 345 350  
 Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln  
 355 360 365  
 Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys  
 370 375 380  
 Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg Val Gln Glu

405 410 415  
 Leu Gly Leu Ser Ala Pro Leu Thr Val Leu Pro Thr Ile Thr Cys Gly  
 420 425 430  
 His Thr Ile Glu Ile Leu Arg Glu Lys Gly Phe Asp Gln Ala Pro Val  
 435 440 445  
 Val Asp Glu Ala Gly Val Ile Leu Gly Met Val Thr Leu Gly Asn Met  
 450 455 460  
 Leu Ser Ser Leu Leu Ala Gly Lys Val Gln Pro Ser Asp Gln Val Gly

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

530 535 540  
 Ala Gln Glu Arg Asp Gln Lys

545 550

<210> 3

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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



50                      55                      60  
 His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile  
 65                      70                      75                      80  
 Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly  
                     85                      90                      95  
 Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe  
  
                     100                      105                      110  
 Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu  
                     115                      120                      125  
 Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu  
                     130                      135                      140  
 Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val  
 145                      150                      155                      160  
 Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu  
  
                     165                      170                      175  
 Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro  
                     180                      185                      190  
 Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp  
                     195                      200                      205  
 Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg  
                     210                      215                      220  
 Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile  
  
 225                      230                      235                      240  
 Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly  
                     245                      250                      255  
 Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys  
                     260                      265                      270  
 Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala  
                     275                      280                      285  
 Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu  
  
                     290                      295                      300

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

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

<210> 4

<211> 1242

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 4

atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gttgcccgca ccgtagcgg	60
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa	120
ccgctgtgga ttctgccga cgcaccgtca cgtgttacct ggcagctggg tcgtccggca	180
agcgaatctc cgcatacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatata	240
ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatgggt cgtatcaaca aaatcgcaa aaaattcgg	300
ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcgggtc cgtgaaagat	360
cgtatctcac tgcgcatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcaccctgaa accgggtgat	420
acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggccggcagtc	480
cgtgggtatc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc	540
ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttcgt accccgacga atgcccgctt cgacagtccg	600
gaatcccatg tgggtgttgc atggcgcctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg	660
gatcagatc gtaacgctag caatccgctg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc	720

ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggctcgctt ctgtgggtac cggcgggtacc 780  
 attacgggca tcgcgcgtaa actgaaagaa aaatgcccgg gctgtcgcgt tatcgggtgtg 840

gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg 900  
 tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tcctggatcg cacgggtggtt 960  
 gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct 1020  
 caggaaggtc tgctgtgcgg tggttcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaagct 1080  
 gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgi gtcgtgattc tgccggattc tgttcgcaac 1140  
 tacatgacca aattttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggcttcct gaaagaagaa 1200  
 gatctgaccg agaaaaaacc gtggtgggtgg cacctgcgct aa 1242

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 5

cgtagaattc acctttgccc gcatgctgat 30

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 6

tacgggtacc tcaacggagg tgccaccacc agggc 35

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic oligonucleotide

<400> 7

agtcgcccat ggcgtcagaa accccgcag 29

<210> 8

<211> 31

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 8  
 atcgcgctcg agttagcgca ggtgccacca c 31  
 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 9  
 ggagatatac catgccgtca gaaacccccgc 30  
 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 10  
 gcgggggtttc tgacggcatg gtatatctcc 30  
  
 <210> 11  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 11  
 tgggtccgac gggtagcccg cac 23  
 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 12  
 gtgcgggcta cccgtcggac cca 23  
 <210> 13

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated human C15S mutant CBS polypeptide

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205



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

Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile  
225 230 235 240

Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly  
245 250 255

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys  
260 265 270

Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala  
275 280 285

Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu  
290 295 300

Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val  
305 310 315 320

Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg  
325 330 335

Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser  
340 345 350

Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln  
355 360 365

Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys  
370 375 380

Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu  
385 390 395 400

Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg  
405 410

<210> 14

<211> 1242

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated human C15S mutant CBS Nucleotide

<400> 14

atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gtagcccgca ccgtagcgg 60  
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa 120

ccgctgtgga ttcgtccgga cgcaccgtca cgtgtacct ggcagctggg tcgtccgga 180  
agcgaatctc cgcatcacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatata 240  
ctgaagaaaa ttgtgacac ccgatggtt cgtatcaaca aaatcgcaa aaaattcgg 300  
ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcgggtt cgtgaaagat 360  
cgtatctcac tgcgatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcacctgaa accgggtgat 420  
acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggcggcagtc 480  
cgtggttatc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc 540

ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttcgt accccgacga atgcccgctt cgacagtccg 600  
gaatcccatg tgggtgttgc atggcgctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg 660  
gatcagtata gtaacgctag caatccgtg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc 720  
ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggtcgctt ctgtgggtac cggcgggtacc 780  
attacgggca tcgcgctaa actgaaagaa aaatgcccg gctgtcgcat tatcggtgtg 840  
gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg 900  
tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tcctggatcg cacggtggtt 960

gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct 1020  
caggaaggtc tgctgtgcgg tggttcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaaagct 1080  
gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtcgtgattc tgccggattc tgttcgcaac 1140  
tacetgacca aatttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggcttcct gaaagaagaa 1200  
gatctgaccg agaaaaaacc gtggtggtgg cacctgcgct aa 1242

<210> 15  
<211> 1656  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Full length human C15S mutant CBS nucleotide  
<  
400> 15  
atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gtagcccgca ccgtagcgg 60  
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa 120  
ccgctgtgga ttcgtccgga cgcaccgtca cgtgtacct ggcagctggg tcgtccgga 180  
agcgaatctc cgcatcacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatata 240

ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatgggt cgtatcaaca aaatcggcaa aaaattcgggt 300  
ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcgggttc cgtgaaagat 360  
cgtatctcac tgcgcatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcaccctgaa accgggtgat 420

acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggccggcagtc 480  
cgtgggttacc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc 540  
ctgcgtgctc tgggcgcgga aattgttctg accccgacga atgcccgctt cgacagtccg 600  
gaatcccatg tgggtgttgc atggcgccctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg 660  
gatcagtatc gtaacgctag caatccgctg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc 720  
ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggtcgctt ctgtgggtac cggcgggtacc 780  
attacgggca tcgcgcgtaa actgaaagaa aaatgcccg gctgtcgcat tatcggtgtg 840

gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg 900  
tatgaagtgt aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tccctggatcg cacgggtggtt 960  
gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct 1020  
caggaaggtc tgctgtgcgg tgggtcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaaagct 1080  
gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtctgtgattc tgccggattc tgttcgcaac 1140  
tacatgacca aatttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggcttcct gaaagaagaa 1200  
gatctgaccg agaaaaaacc gtgggtggtg cacctgcgcg tgcaggaaact gggctctgtcc 1260

gcaccgctga ccgttctgcc gaccatcacg tgcggccata cgattgaaat cctgcgtgaa 1320  
aaaggttttg atcaggcccc ggttctcgac gaagcaggcg tgattctggg tatggttacc 1380  
ctgggtaaca tgctgagttc cctgctggcg ggcaaagtgc aaccgagcga tcaggttggt 1440  
aaagtcatct acaacaatt caaacagatt cgtctgaccg atacgtggg ccgcctgtcg 1500  
cacatcctgg aaatggacca ttctcgctg gttgtgcacg aacagattca ataccatagc 1560  
accggcaaat catcgacg ccaaatggtc ttggtgtcg tgacggccat tgatctgctg 1620  
aatttcgtgg ccgcacaaga acgtgaccag aaataa 1656

<210> 16

<211> 551

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Full length human C15S mutant CBS polypeptide

<400> 16

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

1	5	10	15
His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser			
	20	25	30
Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala			
	35	40	45
Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro			
	50	55	60
His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile			
65	70	75	80
Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly			
	85	90	95
Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe			
	100	105	110
Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu			
	115	120	125
Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu			
	130	135	140
Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val			
145	150	155	160
Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu			
	165	170	175
Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro			
	180	185	190
Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp			
	195	200	205
Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg			
	210	215	220
Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile			
225	230	235	240
Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly			
	245	250	255

Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys  
 260 265 270  
 Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala  
 275 280 285  
 Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu  
 290 295 300  
  
 Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val  
 305 310 315 320  
 Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg  
 325 330 335  
 Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser  
 340 345 350  
 Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln  
 355 360 365  
  
 Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys  
 370 375 380  
 Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg Val Gln Glu  
 405 410 415  
 Leu Gly Leu Ser Ala Pro Leu Thr Val Leu Pro Thr Ile Thr Cys Gly  
 420 425 430  
  
 His Thr Ile Glu Ile Leu Arg Glu Lys Gly Phe Asp Gln Ala Pro Val  
 435 440 445  
 Val Asp Glu Ala Gly Val Ile Leu Gly Met Val Thr Leu Gly Asn Met  
 450 455 460  
 Leu Ser Ser Leu Leu Ala Gly Lys Val Gln Pro Ser Asp Gln Val Gly  
 465 470 475 480  
 Lys Val Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Gln Ile Arg Leu Thr Asp Thr Leu  
 485 490 495  
  
 Gly Arg Leu Ser His Ile Leu Glu Met Asp His Phe Ala Leu Val Val



500	505	510
His Glu Gln Ile Gln Tyr His Ser Thr Gly Lys Ser Ser Gln Arg Gln		
515	520	525
Met Val Phe Gly Val Val Thr Ala Ile Asp Leu Leu Asn Phe Val Ala		
530	535	540
Ala Gln Glu Arg Asp Gln Lys		
545	550	