(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0111011
(43) 공개일자 2024년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *A61K 38/50* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 38/50 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7022597(분할)
(22) 출원일자(국제) 2019년03월22일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7023065
원출원일자(국제) 2019년03월22일
심사청구일자 2022년03월22일
(85) 번역문제출일자 2024년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2019/000290
(87) 국제공개번호 WO 2019/186272
국제공개일자 2019년10월03일
(30) 우선권주장
62/648,775 2018년03월27일 미국(US)

(71) 출원인
엔지반트 테라퓨틱스 게엠베하
스위스, 4051 바젤, 피아둑트슈트라쎄 8
(72) 발명자
코케리 크리스틴
미국, 노스 캐롤라이나 27701, 더럼, 324 블랙웰 스트리트
샘페이 브란테
미국, 노스 캐롤라이나 27701, 더럼, 324 블랙웰 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

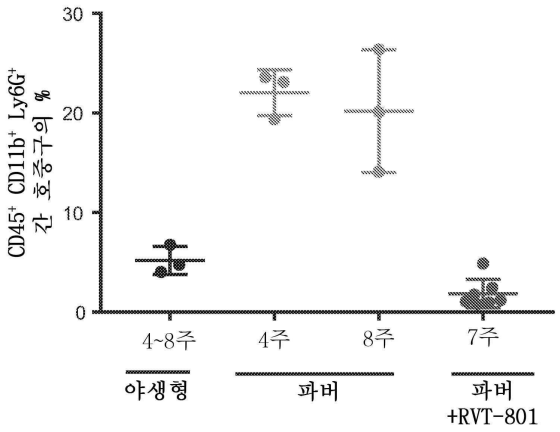
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **파버병 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

파버병(Farber disease)에 대한 면역-표현형 마커 및 이들 마커의 용도가 개시되며, 이들 마커에 기초하여 파버병을 진단하고 치료하는 방법들이 또한 개시된다.

대 표 도 - 도37a



(52) CPC특허분류
A61P 43/00 (2018.01)
G01N 2800/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체가 파버병(Farber disease)을 갖고 있는지 결정하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체로부터의 생물학적 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, SSCmid FSCmid, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, MHCII+CD11b-Ly6C+, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 수준을 검출하는 단계를 포함하며,

여기서, $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, SSC^{mid} FSC^{mid}, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준이 대조군보다 높다면, 대상체는 파버병을 갖고;

$CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준이 대조군보다 낮다면, 대상체는 파버병을 갖는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 MHCII+CD11b-Ly6C+의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}CD38^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 낮은 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 낮은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 검출은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준을 검출함으로써 수행되며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및/또는 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 검출은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하고, 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 추가로 검출함으로써 수행되며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 CD19+CD38+의 수준 및/또는 대조군 수준보다 낮은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준, 및 조합된 검출은 대상체가 파버병을 가짐을 나타내는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 검출은 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, SSC^{mid} FSC^{mid}, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, MHCII+CD11b-Ly6C+, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 10개 마커의 수준을 검출하여, 대상체가 파버병을 갖는지 결정함으로써 수행되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직 추출물 시료 또는 혈액 시료인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간, 비장, 폐 또는 혈액으로부터 수득되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 파버병의 치료에 유용한 치료적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 조성물은 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, rhAC는 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 양으로 투여되는, 방법.

청구항 17

파버병을 진단하는 데 사용하기 위한 설명서가 동봉된, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 키트.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 키트는 마커 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, SSC^{mid} FSC^{mid}, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 또는 $CD19^{-}CD3^{+}$에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는, 키트.

청구항 19

파버병을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$,

$CD11b^{+}CD38^{+}$+, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 수준을 검출하는 단계로서,

여기서, $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, SSC^{mid} FSC^{mid}, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준이 대조군보다 높다면, 대상체는 파버병을 갖고;

$CD11b^{+}CD206^{+}$, MHCII+$CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 CD19-CD3+의 수준이 대조군보다 낮다면, 대상체를 파버병을 갖는, 단계; 및

파버병의 치료에 유용한 치료적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, rhAC는 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 양으로 존재하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대상체가 파버병(Farber disease)을 갖고 있는지 결정하기 위한 방법 및 바이오마커에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 파버병(산 세라미다제 결핍, 지방육아종증(lipogranulomatosis))은 리소좀 산 세라미다제(*ASAH1*) 유전자에서의 돌연변이에 의해 유발되는 희귀한 리소좀 저장 장애이다. 산 세라미다제는 스핑고신 및 지방산으로의 세라마이드의 분해에 관여하고, 산 세라미다제 활성의 결핍은 세라마이드의 축적을 야기한다.

[0003] 백혈구는 파버병의 발병에서 역할을 한다. 염증과 더불어 거품형 조직구(foamy histiocyte)(지질-함유(laden) 대식세포 및 단핵구-유래 집단)에 의한 조직 침윤은 질병의 특징인 육아종의 형성을 촉진한다. 육아종과 세라마이드-유도 만성 염증성 상태 둘 모두는 조직 손상을 야기하는 경향이 있으며, 이때, 결합 조직 및 관절, 폐, 간, 중추신경계 및 2차 림프 기관이 가장 명백히 영향을 받는다. 그러나, 파버병을 야기하는 면역 세포 발달 및 활성화의 특징화는 완전히 개발되지 않았다.

[0004] 재조합 인간 산 세라미다제, rhAC를 이용한, 파버병의 진행성 뮤린 넉-인(knock-in) $Asah1^{P361R/P361R}$ 모델의 치료는 조직 세라마이드 및 염증을 감소시키는 것으로 제시되었다. 2018년 1월 12일에 출원된 국제 출원 PCT/US18/13509 및 문헌[He et al., "Enzyme replacement therapy for Farber disease: Proof-of-concept studies in cells and mice," BBA Clin. 2017 Feb 13; 7:85-96]의 개시내용은 그 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0005] 그러나, 파버병에 대한 향상된 진단 및 치료에 대한 필요성이 계속 남아 있다. 파버병을 확증하기 위한 조직 생검의 종래의 조직학적 평가는 비용이 많이 들며, 침습적이고, 통증, 출혈 또는 심지어 사망을 유발할 수 있다. 예를 들어, 파버병을 진단하며 및/또는 파버병의 치료 효능을 결정하기 위해 파버병의 면역-표현형 마커를 사용하는 간단한 시험이 고도로 바람직하다. 본 주제는 본원에 논의될 바와 같이 다른 필요성도 충족시킨다.

발명의 내용

[0006] 설명에 따르면, 일부 구현예는 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 대상체로부터의 생물학적 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}$ $CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준이 대조군보다 높다면, 대상체는 파버병

을 갖고; $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준이 대조군보다 낮다면, 대상체는 파버병을 갖는다.

[0007] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0008] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$ $CD86^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$ $CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0009] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}CD38^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0010] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 낮은 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0011] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0012] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0013] 일 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 낮은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0014] 일부 구현예에서, 검출은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준을 검출함으로써 수행되며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및/또는 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다. 일부 구현예에서, 검출은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하고, 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 추가로 검출함으로써 수행되며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준 및/또는 대조군 수준보다 낮은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준, 및 조합된 검출은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다. 다른 구현예에서, 검출은 CD11b+Ly6G+, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 10개 마커의 수준을 검출하여, 대상체가 파버병을 갖는지 결정함으로써 수행된다.

[0015] 일부 구현예에서, 생물학적 시료는 조직 추출물 시료 또는 혈액 시료이다. 일부 구현예에서, 생물학적 시료는 간, 비장, 폐 또는 혈액으로부터 수득된다.

[0016] 일부 구현예에서, 상기 방법은 파버병의 치료에 유용한 치료적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함한다. 일부 구현예에서, rhAC는 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 양으로 투여된다.

[0017] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 유효량의 인간 재조합 산 세라미다제를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 재조합 산 세라미다제는 RVT-801이다.

[0018] 일부 구현예에서 약제학적 조성물은 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg의 유효량의 인간 재조합 산 세라미다제를 포함한다. 일부 구현예에서, 인간 재조합 산 세라미다제는 RVT-801이다.

[0019] 다른 구현예는 파버병을 진단하는 데 사용하기 위한 설명서가 동봉된, 상기 상술된 임의의 방법을 수행하기 위한 키트이다.

[0020] 일부 구현예에서, 키트는 마커 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$,

$CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 또는 $CD19^{-}CD3^{+}$에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함한다.

[0021] 다른 구현예는 파버병을 치료하는 방법이며, 상기 방법은: 대상체로부터의 시료에서 CD11b+Ly6G+, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86+$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII+CD11b^{mid}CD23+$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 수준을 검출하는 단계로서, 여기서, $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86+$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준이 대조군보다 높다면, 대상체는 파버병을 갖고; $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준이 대조군보다 낮다면, 대상체를 파버병을 갖는, 단계; 파버병의 치료에 유용한 치료적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg 양의 rhAC를 포함한다.

[0023] 부가적인 목적 및 이점은 부분적으로는, 후속하는 설명에서 제시될 것이고, 부분적으로는 설명으로부터 명확해질 것이거나 실시에 의해 학습될 수 있다. 목적 및 이점은 특히 첨부된 청구항에 제시된 요소 및 조합에 의해 실현되고 달성될 것이다.

[0024] 상기 일반적인 설명 및 하기 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적이며, 청구항을 제약하는 것이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[0025] 본 명세서의 일부에 포함되고 이를 이루는 첨부된 도면은 하나(몇몇의) 구현예(들)를 예시하고, 설명과 함께 본원에 기재된 원리를 설명하는 역할을 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 실시예 1(검정색 외형선은 림프구, 단핵구 및 과립구의 분포를 도시함)에 기재된 바와 같이, 생존한/사멸한 좀비 레드(zombie red)로 염색된 파버 마우스의 비장에서 백혈구 하위집단을 식별하는 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 2a 및 도 2b는 실시예 1(검정색 외형선, 생존 세포)에 기재된 바와 같이, 생존한/사멸한 좀비 레드로 염색된 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 비장 추출물에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 3a 및 도 3b는 실시예 1(검정색 외형선, 생존 세포)에 기재된 바와 같이, 생존한/사멸한 좀비 레드로 염색된 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 폐 추출물에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 4a 및 도 4b는 실시예 1(검정색 외형선, 생존 세포)에 기재된 바와 같이, 생존한/사멸한 좀비 레드로 염색된 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 간 추출물에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 5a 및 도 5b는 실시예 1(검정색 외형선, 생존 세포)에 기재된 바와 같이, 생존한/사멸한 좀비 레드로 염색된 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 혈액에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 비장 및 혈액 각각에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 세포 현탁액을 우선, CD45(공통 백혈구 마커)(검정색 외형선)의 발현에 기초하여 게이팅(gate)하고, 크기의 측정치인 포워드 스캐터(FSC) 및 세포 입상도(granularity)의 측정치인 사이드 스캐터(SSC)를 포함한 물리적 매개변수에 대해 추가로 게이팅하여, 단핵구(SSC^{mid}/FSC^{mid})를 선별하였다. 도 6a는 비장에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 도 6b는 혈액에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 7a 및 도 7b는 도 7a 및 도 7b의 유세포분석 검정법으로부터 수득된 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 연령-매칭된 야생형 한배새끼로부터의 비장 및 혈액 각각의 백혈구($CD45^{+}$ 세포) 및 단핵구($SSC^{mid}FSC^{mid}$ 세포)의 빈도를 도시한다. 도 7a는 비장에서 백혈구($CD45^{+}$ 세포) 및 단핵구($SSC^{mid}FSC^{mid}$ 세포)의 빈도를 도시한다. 도 7b는 혈액에서 백혈구($CD45^{+}$ 세포) 및 단핵구($SSC^{mid}FSC^{mid}$ 세포)의 빈도를 도시한다. 화살표는 파버 마우스에서 단핵구 집단의 변화를 나타낸다.

도 8a 및 도 8b는 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 폐 및 비장 각각에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 세포 현탁액을 CD11b(단핵구/과립구 계통 마커) 및 MHCII(주 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex) 클래스 II; 항원 제시 분자)의 발현에 기초하여 게이팅하여, 대식세포 및 수지상 세포(DC)의 하위세트를 식별하였다: $MHCII^{-}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{mid}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$. 도 8a는 폐에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 도 8b는 비장에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 9a 및 도 9b는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 폐 및 비장 각각에서 대식세포 및 수지상 세포(DC)의 하위세트의 빈도의 정량화를 도시한다: 도 8a 및 도 8b에 도시된 바와 같은 유세포분석 검정법으로부터 $MHCII^{-}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{mid}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$. 도 9a는 폐에서 대식세포 및 수지상 세포(DC)의 하위세트의 빈도의 정량화를 도시한다. 도 9b는 비장에서 대식세포 및 수지상 세포(DC)의 하위세트의 빈도의 정량화를 도시한다.

도 10a 및 도 10b는 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼로부터의 간 및 혈액 각각에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 세포 현탁액을 CD11b(단핵구/과립구 계통 마커) 및 MHCII(주 조직적합성 복합체 클래스 II; 항원 제시 분자)의 발현에 기초하여 게이팅하여, 대식세포 및 수지상 세포(DC)의 하위세트를 식별하였다: $MHCII^{-}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{mid}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$. 도 10a는 간에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 도 10b는 혈액에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다.

도 11은 도 8a, 8b, 10a 및 10b에 도시된 바와 같은 유세포분석 검정법으로부터 폐, 비장, 간 및 혈액 중에서 $MHCII^{-}CD11b^{hi}$ 집단(활성화된 단핵구)의 비교를 도시한다. 화살표는 파버 마우스와 야생형 사이에서 폐 내 단핵구 집단의 증가를 나타낸다.

도 12a 및 도 12b는 도 8a 및 도 8b의 유세포분석 검정법에서 식별되고, Ly6C의 발현에 기초하여 추가로 게이팅된 바와 같은 $MHCII^{+}CD11b^{-}$ 집단을 나타내어, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$(전-염증성 대식세포 및 DC) 및 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{-}$의 하위집단을 각각 식별한다. 도 12a는 폐에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}$ 집단을 도시한다. 도 12b는 비장에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}$ 집단을 도시한다.

도 13a 및 도 13b는 도 12a 및 도 12b에서 식별된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐 및 혈액 각각으로부터의 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 세포(전-염증성 대식세포 및 DC)의 비교를 도시한다. 도 13a는 폐에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 세포의 비교를 도시한다. 도 13b는 혈액에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 세포의 비교를 도시한다.

도 14a 및 도 14b는 도 8a 및 도 8b의 유세포분석 검정법으로부터 $MHCII^{-}CD11b^{+}$ 세포의 마커의 발현 수준의 분포 및 비교를 도시한다. 도 14a는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐로부터의 시료에서 마커, CD23, CD68 및 CD86(활성화된 대식세포)에 대한 발현 수준에 기초하여, 도 8a 및 도 8b의 유세포분석 검정법으로부터 $MHCII^{-}CD11b^{+}$ 세포의 마커의 발현 수준의 분포를 제시한다. 도 14b는 도 14a에 제시된 바와 같은 측정으로부터 수득된 CD23, CD68 및 CD86(활성화된 대식세포)에 대한 평균 형광 강도(MFI)로 표시된 바와 같은, 마커의 발현 수준의 비교를 도시한다.

도 15a 및 도 15b는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 100,000개 혈액 세포 당 $CD11b^{+}CD38^{+}$ 세포(전-염증성 대식세포 및 DC)의 총 카운트(count) 및 빈도의 비교를 도시한다. 도 15a는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 100,000개 혈액 세포 당 $CD11b^{+}CD38^{+}$ 세포(전-염증성 대식세포 및 DC)의 총 카운트의 비교를 도시한다. 도 15b는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐에서의 $CD45b^{+}CD206^{+}$ 세포의 빈도(좌측 패널) 및 혈액에서의 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 빈도(우측 패널)를 도시한다.

도 16은 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐로부터 실시예 1의 $CD45^{+}$ 세포(백혈구)를 $CD11b^{+}$

및/또는 $Ly6G^{+/-}$와 함께 게이팅하여, 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) 및 비-호중구($CD11b^{+}Ly6G^{-}$)를 식별하는 것을 도시한다.

도 17은 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장으로부터 실시예 1의 $CD45^{+}$ 세포(백혈구)를 $CD11b^{+}$ 및/또는 $Ly6G^{+/-}$와 함께 게이팅하여, 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) 및 비-호중구($CD11b^{+}Ly6G^{-}$)를 식별하는 것을 도시한다.

도 18은 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 간으로부터 실시예 1의 $CD45^{+}$ 세포(백혈구)를 $CD11b^{+}$ 및/또는 $Ly6G^{+/-}$와 함께 게이팅하여, 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) 및 비-호중구($CD11b^{+}Ly6G^{-}$)를 식별하는 것을 도시한다.

도 19는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 혈액으로부터 실시예 1의 $CD45^{+}$ 세포(백혈구)를 $CD11b^{+}$ 및/또는 $Ly6G^{+/-}$와 함께 게이팅하여, 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$) 및 비-호중구($CD11b^{+}Ly6G^{-}$)를 식별하는 것을 도시한다.

도 20a 내지 도 20d는 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐, 비장, 간 및 혈액 각각에서 도 16 내지 도 19에서와 같이 식별된 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 빈도를 비교한다. 도 20a는 폐에서 도 16 내지 도 19에서와 같이 식별된 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 빈도를 비교한다. 도 20b는 비장에서 도 16 내지 도 19에서와 같이 식별된 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 빈도를 비교한다. 도 20c는 간에서 도 16 내지 도 19에서와 같이 식별된 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 빈도를 비교한다. 도 20d는 혈액에서 도 16 내지 도 19에서와 같이 식별된 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 빈도를 비교한다.

도 21은 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 CD45 및 CD3(검정색 외형선)에 대해 이중 양성으로서 T 세포를 선별하기 위해 추가로 게이팅된 $CD19^{-}$ 세포(비-B 세포)를 도시한다.

도 22는 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐에서 CD45 및 CD3(검정색 외형선)에 대해 이중 양성으로서 T 세포를 선별하기 위해 추가로 게이팅된 $CD19^{-}$ 세포(비-B 세포)를 도시한다.

도 23은 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 혈액에서 CD45 및 CD3(검정색 외형선)에 대해 이중 양성으로서 T 세포를 선별하기 위해 추가로 게이팅된 $CD19^{-}$ 세포(비-B 세포)를 도시한다.

도 24는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장, 폐 및 혈액 각각에서 도 21 내지 도 23에서와 같이 식별된 T 세포($CD19^{-}CD3^{+}$) 집단의 빈도를 비교한다. 도 24a는 비장에서 T 세포($CD19^{-}CD3^{+}$) 집단의 빈도를 보고한다. 도 24b는 폐에서 T 세포($CD19^{-}CD3^{+}$) 집단의 빈도를 보고한다. 도 24a는 혈액에서 T 세포($CD19^{-}CD3^{+}$) 집단의 빈도를 보고한다.

도 25는 실시예 1에 기재된 바와 같이 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장으로부터 CD19(pan-B 세포 마커)(검정색 외형선)의 이들의 발현에 기초하여 추가로 게이팅된 $CD45^{+}$ 세포를 도시한다.

도 26은 실시예 1에 기재된 바와 같이 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 마우스의 비장으로부터 CD38(활성화된 림프구, 형질아세포 마커)의 이들의 발현에 기초하여 추가로 게이팅된 $CD45^{+}CD19^{+}$ 세포(B 세포)를 도시한다.

도 27a 및 도 27b는 도 25 및 도 26 각각에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 B 세포 및 활성화된 B 세포 각각의 빈도를 비교한다. 도 27a는 도 25에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 B 세포($CD45^{+}CD19^{+}$)의 빈도를 비교한다. 도 27b는 도 26에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 활성화된 B 세포 또는 형질아세포($CD19^{+}CD38^{+}$)의 빈도를 비교한다.

도 28은 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 혈액으로부터 CD38(활성화된 림

프구, 형질아세포 마커)의 이들의 발현에 기초하여 추가로 게이팅된 $CD45^{+}CD19^{+}$ 세포(B 세포)를 도시한다.

도 29a 및 도 29b는 도 28에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 $CD45^{+}CD19^{+}$ 세포(B 세포) 및 $CD19^{+}CD38^{+}$ 세포(활성화된 B 세포 또는 형질아세포) 각각의 빈도를 비교한다. 도 29a는 도 28에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 $CD45^{+}CD19^{+}$ 세포(B 세포)의 빈도를 비교한다. 도 29b는 도 28에서 유세포분석 검정법으로부터 수득된 바와 같이, 실시예 1에 따라 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장에서 $CD19^{+}CD38^{+}$ 세포(활성화된 B 세포 또는 형질아세포)의 빈도를 비교한다.

도 30a 및 도 30b는 $CD45^{+}$ 세포에 대해 게이팅된, 실시예 1에 기재된 바와 같이 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐 및 간 각각에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 검정색 외형선은 $CD45^{hi}SSC^{hi}$ 집단을 나타낸다. 도 30a는 $CD45^{+}$ 세포에 대해 게이팅된, 실시예 1에 기재된 바와 같이 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 검정색 외형선은 $CD45^{hi}SSC^{hi}$ 집단을 나타낸다. 도 30b는 $CD45^{+}$ 세포에 대해 게이팅된, 실시예 1에 기재된 바와 같이 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 간에 대한 유세포분석 검정법을 도시한다. 검정색 외형선은 $CD45^{hi}SSC^{hi}$ 집단을 나타낸다.

도 31은 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 비장으로부터 CD23+(성숙한 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 여포(follicular) 수지상 세포, 및 혈소판)로 추가로 게이팅된, $MHCII^{+}CD11b^{mid}$ 세포를 도시한다.

도 32a 및 도 32b는 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐로부터 CD23+(성숙한 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 여포 수지상 세포, 및 혈소판)로 추가로 게이팅된 $MHCII^{+}CD11b^{mid}$ 세포 및 이들의 빈도를 도시한다. 도 32a는 실시예 1에 기재된 바와 같이, 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 한배새끼의 폐로부터 CD23+(성숙한 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 여포 수지상 세포, 및 혈소판)로 추가로 게이팅된 $MHCII^{+}CD11b^{mid}$ 세포를 도시한다. 도 32b는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 야생형 마우스의 폐 중에서 도 32a에 도시된 바와 같이 유세포분석 검정법으로부터 $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 세포의 빈도의 비교를 도시한다.

도 33a 내지 도 33d는 폐, 비장, 간 및 혈액을 포함하여, 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다. 도 33a는 실시예 1에 따라 파버 마우스의 폐에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다. 도 33b는 실시예 1에 따라 파버 마우스의 비장에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다. 도 33c는 실시예 1에 따라 파버 마우스의 간에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다. 도 33d는 실시예 1에 따라 파버 마우스의 혈액에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다.

도 34a 내지 도 34e는 실시예 2에 기재된 바와 같이, 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 "넉-인" 마우스에서 마우스 비장세포의 대표적인 면역표현형화 게이팅 전략을 도시한다. 도 34a 내지 도 34e는 가공으로부터의 세포성 찌꺼기를 제거하기 위해 크기(SSC x FSC)에 기초하여 우선 게이팅된 세포 집단을 도시한다(도 34a). 이 집단은 좀비 레드 염료에 대해 양성인 세포 집단을 제거하기 위해 생존 세포 및 사멸한 세포에 기초하여 추가로 게이팅되었다(도 34b). 그 후에, 생존 세포는 CD45+ 집단을 선별하기 위해 게이팅되었다(도 34c). 이 집단은, Ly6G 및 CD11b 이중 양성인 $CD45^{+}$ 세포; 또는 호중구의 퍼센트를 결정하기 위해 추가로 게이팅되었다(도 34d). 잔여 집단은 시료 유형 당 활성화된 단핵구의 집단을 결정하기 위해 $CD11b^{+}MHCII^{-}$ 집단에 대해 선별하기 위해 선별되고 게이팅되었다(도 34e).

도 35a 내지 도 35c는 야생형(WT) 마우스, 비히클(식염수)로 치료받은 파버 "넉-인" 마우스 또는 반복 용량의 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 비장 면역 세포 집단을 도시한다. 비장 면역 세포 집단은 실시예 3에 기재된 바와 같이 WT 비장 면역 세포 집단과 비교한 경우 대조군 파버 마우스에서 상승

되고, 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 저하된다. 도 35a는 $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6G^{+}$ 비장 호중구의 세포 집단을 도시한다. 도 35b는 $CD45^{+}CD11b^{hi}MHCII^{-}$ 활성화된 비장 단핵구의 세포 집단을 도시한다. 도 35c는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 4 내지 8 주령 WT 마우스에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다.

도 36a 내지 도 36c는 WT 마우스, 비히클(식염수)로 치료받은 파버 "넉-인" 마우스 또는 반복 용량의 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 전신 면역 세포 집단을 도시한다. 전신 면역 세포 집단은 실시예 4에 기재된 바와 같이 WT 전신 면역 세포 집단과 비교한 경우 대조군 파버 마우스에서 상승되고, 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 저하된다. 도 36a는 $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6C^{+}$ 혈액 호중구의 세포 집단을 도시한다. 도 36b는 $CD45^{+}CD11b^{hi}MHCII^{-}$ 활성화된 혈액 단핵구의 세포 집단을 도시한다. 도 36c는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 4 내지 8 주령 WT 마우스에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다.

도 37a 내지 도 37d는 WT 마우스, 비히클(식염수)로 치료받은 파버 "넉-인" 마우스 또는 반복 용량의 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 폐 면역 세포 집단을 도시하며, 폐 면역 세포 집단은 실시예 5에 기재된 바와 같이 WT 폐 면역 세포 집단과 비교한 경우 대조군 파버 마우스에서 상승되고, 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 저하된다. 도 37a는 $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6G^{+}$ 간 호중구의 세포 집단을 도시한다. 도 37b는 $CD45^{+}CD11b^{hi}MCHCII^{-}$ 활성화된 폐 단핵구의 세포 집단을 도시한다. 도 37c는 $CD45^{+}Ly6C^{+}MHCII^{+}CD11b^{-}$ 활성화된 폐 대식세포의 세포 집단을 도시한다. 도 37d는 4 주령 및 8 주령 파버 마우스 및 4 내지 8 주령 WT 마우스에서 유세포분석 검정법으로부터 식별된 모든 세포성 하위집단에 기초한 면역-핑거프린트를 도시한다.

도 38a 및 도 38b는 WT 마우스, 식염수로 치료받은 파버 "넉-인" 마우스 또는 반복 용량의 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 간 면역 세포 집단을 도시하며, 간 면역 세포 집단은 실시예 6에 기재된 바와 같이 WT 간 면역 세포 집단과 비교한 경우 대조군 파버 마우스에서 상승되고, 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스에서 저하된다. 도 38a는 $CD45^{+}CD11b^{+}Ly6G^{+}$ 간 호중구의 세포 집단을 도시한다. 도 38b는 $CD45^{+}CD11b^{hi}MCHCII^{-}$ 활성화된 간 단핵구의 세포 집단을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] **서열의 설명**

[0028] 표 1은 본원에서 참조된 소정의 서열의 목록을 제공한다.

표 1

SEQ ID NO	설명	서열
1	재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)(아미노산)	MPGRSCVALVLLAAAVSCAVAQHAPPWTEDCRKSTYPP SGPTYRGAVPWYTINLDLPPYKRWHELMLDKAPVLKVI VNSLKNMINTFVPSGKIMQVVDEKLPGLLGNFPGPFEEE MKGIAAVTDIPLGEIISFNIFYELFTICTSIVAEDKKGHLIH GRNMDFGVFLGWNINNDTWVITEQLKPLTVNLDFQRNN KTVFKASSFAGYVGMLTGFKPGLFSLTLNERFSINGGYL GILEWILGKKDVMWIGFLTRTVLENSTSYEEAKNLLTKT KILAPAYFILGGNQSGEGCVITRDRKESLDVYELDAKQG RWYVVQTNYDRWKHPFFLDDRRTPAKMCLNRTSQENI SFETMYDVLSTKPVLNKLTVYTTLIDVTKGQFETYLRDC PDPCIGW
2	rhAC (DNA)	GGCTCGGTCCGACTATTGCCCGCGGTGGGGGAGGGGG ATGGATCACGCCACGCGCCAAAGGCGATCGCGACTCT CCTTCTGCAGGTAGCCTGGAAGGCTCTCTCTCTTTCTC TACGCCACCCTTTTCGTGGCACTGAAAAGCCCCGTCCT CTCCTCCCAGTCCCGCCTCCTCCGAGCGTTCCCCCTAC TGCCTGGAATGGTGCGGTCCCAGGTCGCGGGTCACGC GGCGGAGGGGGCGTGGCCTGCCCCCGGCCCAGCCGG CTCTTCTTTGCCTCTGCTGGAGTCCGGGGAGTGGCGTT GGCTGCTAGAGCGATGCCGGGCCGGAGTTGCGTCGCC TTAGTCCTCCTGGCTGCCGCCGTCAGCTGTGCCGTCGC GCAGCACGCGCCGCCGTGGACAGAGGACTGCAGAAA ATCAACCTATCCTCCTTCAGGACCAACGTACAGAGGT GCAGTTCCATGGTACACCATAAATCTTGACTTACCAC CCTACAAAAGATGGCATGAATTGATGCTTGACAAGGC ACCAGTGCTAAAGGTTATAGTGAATTCTCTGAAGAAT ATGATAAATACATTCGTGCCAAGTGGAAAAATTATGC AGGTGGTGGATGAAAAATTGCCTGGCCTACTTGGCAA CTTTCCTGGCCCTTTTGAAGAGGAAATGAAGGGTATT GCCGCTGTTACTGATATACCTTTAGGAGAGATTATTTC ATTCAATATTTTTTATGAATTATTTACCATTTGTACTTC

[0029]

[0030]

		AATAGTAGCAGAAGACAAAAAAGGTCATCTAATACA TGGGAGAAACATGGATTTTGGAGTATTTCTTGGGTGG AACATAAATAATGATACCTGGGTCATAACTGAGCAAC TAAAACCTTTAACAGTGAATTTGGATTTCCAAAGAAA CAACAAAACTGTCTTCAAGGCTTCAAGCTTTGCTGGC TATGTGGGCATGTTAACAGGATTCAAACCAGGACTGT TCAGTCTTACACTGAATGAACGTTTCAGTATAAATGG TGGTTATCTGGGTATTCTAGAATGGATTCTGGGAAAG AAAGATGTCATGTGGATAGGGTTCCTCACTAGAACAG TTCTGGAAAATAGCACAAGTTATGAAGAAGCCAAGA ATTTATTGACCAAGACCAAGATATTGGCCCCAGCCTA CTTTATCCTGGGAGGCAACCAGTCTGGGGAAGGTTGT GTGATTACACGAGACAGAAAGGAATCATTGGATGTAT ATGAACTCGATGCTAAGCAGGGTAGATGGTATGTGGT ACAAACAAATTATGACCGTTGGAAACATCCCTTCTTC CTTGATGATCGCAGAACGCCTGCAAAGATGTGTCTGA ACCGCACCAGCCAAGAGAATATCTCATTTGAAACCAT GTATGATGTCCTGTCAACAAAACCTGTCCTCAACAAG CTGACCGTATACACAACCTTGATAGATGTTACCAAAG GTCAATTCGAAACTTACCTGCGGGACTGCCCTGACCC TTGTATAGGTTGGTGAGCACACGTCTGGCCTACAGAA TGCGGCCTCTGAGACATGAAGACACCATCTCCATGTG ACCGAACACTGCAGCTGTCTGACCTTCCAAAGACTAA GACTCGCGGCAGGTTCTCTTTGAGTCAATAGCTTGTCT TCGTCCATCTGTTGACAAATGACAGATCTTTTTTTTTT CCCCCTATCAGTTGATTTTTCTTATTTACAGATAACTT CTTTAGGGGAAGTAAAACAGTCATCTAGAATTCACTG AGTTTTGTTTCACTTTGACATTTGGGGATCTGGTGGGC AGTCGAACCATGGTGAACTCCACCTCCGTGGAATAAA TGGAGATTCAGCGTGGGTGTTGAATCCAGCACGTCTG TGTGAGTAACGGGACAGTAAACACTCCACATTCTTCA GTTTTTCACTTCTACCTACATATTTGTATGTTTTTCTGT ATAACAGCCTTTTCCTTCTGGTTCTAACTGCTGTTAAA

		ATTAATATATCATTATCTTTGCTGTTATTGACAGCGAT ATAATTTTATTACATATGATTAGAGGGATGAGACAGA CATTCACCTGTATATTTCTTTTAATGGGCACAAAATGG GCCCTTGCCTCTAAATAGCACTTTTTGGGGTTCAAGAA GTAATCAGTATGCAAAGCAATCTTTTATACAATAATT GAAGTGTTCCCTTTTTCATAATTACTCTACTTCCCAGT AACCCTAAGGAAGTTGCTAACTTAAAAAACTGCATCC CACGTTCTGTTAATTTAGTAAATAAACAAGTCAAAGA CTTGTGGAAAATAGGAAGTGAACCCATATTTTAAATT CTCATAAGTAGCATTCATGTAATAAACAGGTTTTTAGT TTGTTCTTCAGATTGATAGGGAGTTTTAAAGAAATTTT AGTAGTTACTAAAATTATGTTACTGTATTTTTCAGAAA TCAAACTGCTTATGAAAAGTACTAATAGAACTTGTTA ACCTTTCTAACCTTCACGATTAACTGTGAAATGTACGT CATTTGTGCAAGACCGTTTGTCCACTTCATTTTGTATA ATCACAGTTGTGTTCCTGACACTCAATAAACAGTCAC TGGAAAGAGTGCCAGTCAGCAGTCATGCACGCTGATT GGGTGTGT
3	rhAC (DNA)	AAGCTTACCGCCACCATGAACTGCTGCATCGGCCTGG GTGAGAAGGCGCGTGGCTCGCACCGCGCCAGCTACCC CTCCCTGAGCGCCCTCTTCACCGAGGCGTCCATCCTCG GATTCGGGAGCTTCGCCGTCAAGGCACAGTGGACCGA GGATTGCCGCAAGAGTACGTACCCCCCCAGTGGCCCG ACGTACCGCGGCGCCGTCCCCTGGTACACGATCAACC TGGACCTCCCCCCGTACAAGCGCTGGCACGAGTTGAT GCTGGACAAGGCCCCCGTACTGAAGGTCATCGTGAAC TCCCTGAAGAACATGATCAACACCTTCGTCCCCTCGG GCAAGATCATGCAGGTCGTGGACGAGAAGCTGCCCG GGCTCCTCGGCAACTTCCCCGGCCCGTTCGAAGAGGA GATGAAGGGCATCGCGGCCGTCACTGACATCCCCCTG GGCGAGATCATCAGCTTCAACATCTTCTACGAGCTGT TCACCATCTGCACCTCCATCGTAGCCGAGGACAAGAA GGGCCACCTGATCCACGGTCGCAACATGGACTTCGGC

[0031]

		GTCTTCCTGGGCTGGAACATCAACAACGACACCTGGG TCATCACCGAGCAGCTGAAGCCGCTCACCGTGAACCT CGATTTCCAGCGCAACAACAAGACGGTGTTCAAGGCC AGCTCCTTCGCCGGGTACGTCGGGATGCTCACGGGCT TCAAGCCGGGACTGTTCTCGCTGACCCTCAACGAGCG GTTCTCCATCAACGGGGGCTACCTCGGCATCCTGGAG TGGATTCTCGGCAAGAAGGACGTGATGTGGATCGGCT TCCTCACACGGACCGTGCTGGAAAACTCCACTAGTTA CGAGGAGGCCAAGAACCTGCTGACCAAGACGAAGAT CCTGGCCCCGGCATACTTCATCCTGGGCGGCAACCAG TCGGGCGAGGGGTGCGTCATCACCCGCGACCGGAAG GAGTCCCTGGACGTCTATGAGCTGGACGCCAAGCAGG GCCGCTGGTACGTCGTCCAGACGAACTACGACCGATG GAAGCACCCCTTCTTCCTCGACGACCGGCGCACGCCC GCCAAGATGTGCCTGAACCGCACCAGCCAGGAGAAC ATCTCGTTCGAGACGATGTACGACGTGCTGTCGACCA AGCCCGTGCTCAACAAGCTGACGGTCTACACCACGCT GATCGACGTGACGAAAGGCCAGTTCGAAACGTACCTG CGGGACTGCCCGGACCCTTGCATCGGCTGGTGATAAT CTAGAGTCGGGGCGGCCGGCC
4	rhAC (DNA)	AAGCTTACCGCCACCATGAACTGCTGCATCGGGCTGG GAGAGAAAGCTCGCGGGTCCCACCGGGCCTCCTACCC AAGTCTCAGCGCGCTTTTCACCGAGGCCTCAATTCTG GGATTTGGCAGCTTTGCTGTGAAAGCCCAATGGACAG AGGACTGCAGAAAATCAACCTATCCTCCTTCAGGACC AACGTACAGAGGTGCAGTTCCATGGTACACCATAAAT CTTGACTTACCACCCTACAAAAGATGGCATGAATTGA TGCTTGACAAGGCACCAGTGCTAAAGGTTATAGTGAA TTCTCTGAAGAATATGATAAATACATTCGTGCCAAGT GGAAAAATTATGCAGGTGGTGGATGAAAAATTGCCTG GCCTACTTGGCAACTTTCCTGGCCCTTTTGAAGAGGA AATGAAGGGTATTGCCGCTGTTACTGATATACCTTTA GGAGAGATTATTTCATTCAATATTTTTTATGAATTATT

[0032]

		TACCATTTGTACTTCAATAGTAGCAGAAGACAAAAAA GGTCATCTAATACATGGGAGAAACATGGATTTTGGAG TATTTCTTGGGTGGAACATAAATAATGATACCTGGGT CATAACTGAGCAACTAAAACCTTTAACAGTGAATTTG GATTTCCAAAGAAACAACAAAACTGTCTTCAAGGCTT CCAGCTTTGCTGGCTATGTGGGCATGTTAACAGGATT CAAACCAGGACTGTTCAGTCTTACACTGAATGAACGT TTCAGTATAAATGGTGGTTATCTGGGTATTCTAGAATG GATTCTGGGAAAGAAAGATGTCATGTGGATAGGGTTC CTCACTAGAACAGTTCTGGAAAATAGCACAAGTTATG AAGAAGCCAAGAATTTATTGACCAAGACCAAGATATT GGCCCCAGCCTACTTTATCCTGGGAGGCAACCAGTCT GGGGAAGGTTGTGTGATTACACGAGACAGAAAGGAA TCATTGGATGTATATGAACTCGATGCTAAGCAGGGTA GATGGTATGTGGTACAAACAAATTATGACCGTTGGAA ACATCCCTTCTTCCTTGATGATCGCAGAACGCCTGCAA AGATGTGTCTGAACCGCACCAGCCAAGAGAATATCTC ATTTGAAACCATGTATGATGTCCTGTCAACAAAACCT GTCCTCAACAAGCTGACCGTATACACAACCTTGATAG ATGTTACCAAAGGTCAATTCGAAACTTACCTGCGGGA CTGCCCTGACCCTTGTATAGGTTGGTGATAACCTAGG GTCGGGGCGGCCGGCC

[0033]

[0034] 일 구현예에서, "RVT-801"은 파버병의 치료를 위한 활성화된 형태의 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)이다. 활성화된 rhAC의 알파 하위단위 및 베타 하위단위는 이황화 결합에 의해 접합된다. 분자는 rhAC를 발현하는 DNA 플라스미드 벡터로 형질감염된 CHO-M 세포로부터 유래된 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)이다. Rvt-801은 UniProt KB 코드: Q13510에 기초한다.

[0035] RVT-801은, 재조합적으로 생성된 산 세라미다제를 i) 양이온 교환 크로마토그래피; ii) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC); 및 iii) 음이온 교환 크로마토그래피로부터 선택되는 적어도 2개의 크로마토그래피 단계를 받게 하는 단계; 및 용액 중 재조합적으로 생성된 산 세라미다제를 하나 이상의 바이러스 불활성화 단계를 받게 하는 단계를 포함하는 방법에 의해 적어도 95% 활성화된 형태의 순도까지 정제된 재조합적으로 생성된 산 세라미다제(rhAC)를 포함하며, 여기서, rhAC 용액은 3.7 이하의 pH까지 적정된다. RVT-801의 단백질 서열은 SEQ ID NO: 1에 상응한다.

[0036] 일 구현예에서, rhAC의 정제는 2018년 9월 24일에 출원된 PCT/2018/052463에 개시된 방법에 따라 수행될 수 있으며, 이는 그 전문이 참조에 의해 본원에 포함된다. RVT-801 rhAC의 치료 효과는 중증 파버병의 뮤린 모델에서 확립되었고(He, 등, 2017), 축적된 세라마이드의 병행되는(concomitant) 감소와 함께 조직병리학적 및 면역학적 성과(outcome)에 긍정적인 영향을 기재하는 종점을 이용하여 다수의 연구에 걸쳐 특징화되었다.

[0037] 본 발명의 이러한 양태 및 모든 양태에서 사용될 수 있는 활성 AC 및 불활성 AC 전구체 단백질의 다른 구현예는 제한 없이, US 2016/0038574의 표 1에 제시된 것들을 포함하며, 이의 내용은 참조에 의해 본원에 포함된다.

[0038] 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 1의 상동체인 단백질인 단백질이다.

[0039] 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 2의 핵산 분자에 의해 인코딩된다.

[0041] 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 3의 핵산 분자에 의해 인코딩된다.

[0042] 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 4의 핵산 분자에 의해 인코딩된다.

[0043] 일부 구현예에서, rhAC의 서열은 GenBank 기탁 번호 NM_177924.3 또는 NM_177924.4에서 정의된 바와 같으며, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 포함된다. 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, 또는 SEQ ID NO: 4에 제시된 완전 서열일 수 있거나, 단순히 상기 서열의 코딩 영역일 수 있다. 코딩 영역은 예를 들어, SEQ ID NO: 2의 뉴클레오타이드 313 내지 1500 또는 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4에서 확인된 상응하는 코딩 영역일 수 있을 것이다. 그러나, 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 유전자 코드는 축퇴되고, 따라서, 다른 코돈은 개시된 것으로부터 벗어나지 않으면서 동일한 단백질을 인코딩하는 데 사용될 수 있다. 아미노산 서열이 알려져 있기 때문에, 아미노산 서열을 인코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열은 허용 가능하다.

[0044] 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오타이드 313 내지 375에 의해 인코딩되는 아미노산 서열이다.

[0045] 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 1~21의 신호 펩타이드를 포함한다.

[0046] 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 신호 펩타이드, 예컨대 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 1~21의 신호 펩타이드를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 효소가 이의 상이한 하위단위로 가공되는 번역-후 가공 동안 제거된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은, 단백질이 발현되고 있는 세포에 대해 최적화된 코돈이다. 일부 구현예에서, 단백질은 알파-하위단위, 베타-하위단위 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 22~142, 45~139, 134~379, 143~395, 또는 1~395의 펩타이드를 포함한다. 펩타이드는 효소를 형성하기 위한 상이한 서열의 단일 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질은 아미노산 잔기 1~21이 없다. 이들 영역은 단일 뉴클레오타이드 서열 또는 개별 뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열들의 조합에 의해 인코딩될 수 있다. 본원에서 논의된 바와 같이, 단백질을 인코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열이 사용될 수 있고, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4로서 본원에 기재된 서열에 제한되지 않는다.

[0047] 일부 구현예에서, rhAC는 산 세라미다제(AC) 활성을 갖지만, 임의의 검출 가능한 산 스핑고미엘리나제 활성, 예컨대 하기 실시예에서 생성되는 rhAC를 갖지 않는다. 산 스핑고미엘리나제 활성은 예를 들어, 열 불활성화에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 20160038574를 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 포함된다. 열 불활성화는 또한, rhAC 조제물로부터 다른 오염성 단백질을 제거할 수 있다.

[0048] 일부 구현예에서, 정제된 재조합적으로 생성된 산 세라미다제는 적어도 90%, 93%, 95%, 98% 또는 99%의 순도, 또는 100%의 순도를 가진다.

[0049] 일부 구현예에서, 정제된 재조합적으로 생성된 산 세라미다제는 검출 가능한 산 스핑고미엘리나제 활성을 갖지 않는다.

[0050] 일부 구현예에서, 재조합적으로 생성된 산 세라미다제의 산 스핑고미엘리나제 활성은 열의 사용 없이 제거된다.

[0051] **구현예에 대한 설명**

[0052] 본 출원은 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하기 위한 마커, 방법, 장치, 시약, 시스템 및 키트를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커를 사용하여 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하는 방법이 제공된다. 기재된 마커를 갖는 대상체에서 파버병을 치료하는 방법이 또한, 개시된다.

[0053] **A. 정의**

[0054] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당업계의 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치 및 물질이 본 발명의 실행에 사용될 수 있더라도, 소정의 방법, 장치 및 물질이 본원에 기재된다.

[0055] 당업자는, 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질이 본 발명의 실행에 사용될 수 있음을 인식할 것이다. 본 발명은 어떠한 방식으로도, 기재된 방법 및 물질에 제한되지 않는다.

[0056] 본원에서 인용된 모든 공개, 공개된 특허 문헌, 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 공개, 공개된 특허 문헌, 또는 특허 출원이 참조에 의해 포함된 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 나타낸 것과 동일한 정도까지 참조에 의해 본원에 포함된다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 단수형("a" 또는 "an")은 문맥상 명확하게 다르게 나타내지 않는 한 "적어도 하나의" 또는 "하나 이상의"를 의미한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 수치는 근사값이고 작은 변동은 개시된 구현예의 실행에 유의하게 영향을 주지 않을 것임을 의미한다. 수치 제한이 사용되는 경우, 문맥상 다르게 나타내지 않는 한, "약"은 수치가 ±10%만큼 다양하고 개시된 구현예의 범위 내에 남아 있을 수 있음을 의미한다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "동물"은 인간 및 비-인간 척추동물, 예컨대 야생 동물, 가축, 및 농장 동물을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 동물은 또한, "대상체"로 지칭될 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, "마커" 및 "마커"는 개체에서 정상적인 또는 비정상적인 과정의 징후 또는 개체에서 질병 또는 다른 질환의 징후를 나타내거나 징후인 표적 분자를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 보다 구체적으로, "마커" 또는 "마커"는 정상적인지 또는 비정상적인지 그리고 비정상적이라면 만성인지 또는 급성인지, 특정 생리학적 상태 또는 과정의 존재와 연관된 해부학적, 생리학적, 생화학적 또는 분자 매개변수이다. 마커는 실험실 검정법 및 의학적 이미징을 포함한 여러 가지 방법에 의해 검출 가능하고 측정 가능하다. 일부 구현예에서, 마커는 표적 단백질이다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이, "마커 수준" 및 "수준"은, 생물학적 시료에서 마커를 검출하기 위한 임의의 분석 방법을 사용하여 수행되고, 생물학적 시료에서 마커의, 마커에 대한, 또는 마커에 상응하는 존재, 부재(absence), 절대 양 또는 농도, 상대 양 또는 농도, 역가, 수준, 발현 수준, 측정된 수준의 비 등을 나타내는 측정을 지칭한다. "수준"의 정확한 성질은 마커를 검출하는 데 이용되는 특정 분석 방법의 구체적인 디자인 및 구성성분에 따라 달라진다.

[0063] 표적 분자의 "대조군 수준" 또는 "대조군"은 질병 또는 질환을 갖지 않는 개체로부터의, 또는 질병 또는 질환을 갖고 있는 것으로 의심되지 않는 개체로부터의 동일한 시료 유형에서 표적 분자의 수준을 지칭한다. 표적 분자의 "대조군 수준"은 본 방법이 수행될 때마다 결정될 필요는 없고, 특정 시료에서의 수준이 정상 수준보다 높거나 낮은지 결정하기 위해 기준 또는 역치로서 사용되는 이전에 결정된 수준일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에서 대조군 수준은 파버병이 없는 하나 이상의 대상체에서 관찰되어 온 수준이다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법에서 대조군 수준은 복수의 정상적인 대상체 또는 파버병이 없는 대상체에서 관찰되어 온 평균적(average) 또는 평균(mean) 수준, 선택적으로 + 또는 - 통계학적 변동이다.

[0064] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 보조제 또는 부형제를 의미한다. 약제학적 담체는 액체, 예컨대 물, 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 등을 포함한 오일일 수 있다. 약제학적 담체는 또한, 식염수, 검 아카시아, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크(talc), 케라틴, 콜로이드 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한, 보조, 안정화, 증점, 윤활 및 착색 작용제가 사용될 수 있다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는(comprising)"(및 임의의 형태의 포함하는, 예컨대 "포함하다", "포함한다" 및 "포함되는"), "갖는"(및 임의의 형태의 갖는, 예컨대 "가지다" 및 "갖다"), "포함하는(including)"(및 임의의 형태의 포함하는, 예컨대 "포함하다" 및 "포함한다"), 또는 "함유하는"(및 임의의 형태의 함유하는, 예컨대 "함유한다" 및 "함유하다")은 포함적이거나 끝이 열려 있고, 부가적인, 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 부가적으로, 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 용어는 또한, 용어 "~로 구성되는" 또는 "~로 본질적으로 구성되는"과 함께 사용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "접촉시키는"은 시험관내 시스템 또는 생체내 시스템에서 2 가지 요소를 함께 가져오는 것을 의미한다. 예를 들어, rhAC 폴리펩타이드를 개체, 대상체 또는 세포와 "접촉시키는 것"은 상기 폴리펩타이드를 개체 또는 환자, 예컨대 인간에게 투여하는 것, 뿐만 아니라 화합물을 상기 폴리펩타이드를 함유하는 세포성 또는 정제된 조제물을 함유하는 시료 내로 도입하는 것을 포함한다. 부가적으로, 접촉시키는 것은 세포를, 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자로 형질감염시키거나 감염시키는 것을 지칭할 수 있다.

[0067] "진단하다", "진단하는", "진단" 및 이의 변형은 개체에 관한 하나 이상의 징후, 증상, 데이터 또는 다른 정보에 기초하여, 해당 개체의 건강 상태 또는 조건의 검출, 결정 또는 인식을 지칭한다. 개체의 건강 상태는 건강한 / 정상적인 것으로 진단되거나(즉, 질병 또는 질환의 부재의 진단) 병이 있거나 / 비정상적인 것으로 진단될 수 있다(즉, 질병 또는 질환의 존재의 진단, 또는 특징의 평가). 용어 "진단하다", "진단하는", "진단" 등은 개체에게 치료 또는 치료법의 투여 후 특정 질병 또는 질환에 관하여, 질병의 초기 검출; 질병의 특징화 또는 분류; 질병의 진행, 차도(remission) 또는 재발의 검출; 및 질병 반응의 검출을 포괄한다. 파버병의 진단은 파버

병을 갖고 있지 않은 개체로부터 파버병을 갖는 개체를 구분하는 단계를 포함한다.

[0068] 개체에게 전달되는 효소의 "유효량"은, 임상적 향상이 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 정의된 매개변수 중 임의의 매개변수에 의해 측정되는 파버병의 임상적 경과를 향상시키기에 충분한 양이다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "X 내지 Y의 정수"는 종점을 포함하는 임의의 정수를 의미한다. 예를 들어, 어구 "X 내지 Y의 정수"는 1, 2, 3, 4 또는 5를 의미한다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단리된"은, 본원에 기재된 화합물이 (a) 천연 공급원, 예컨대 식물 또는 세포, 또는 (b) 합성 유기 화학 반응 혼합물의 다른 구성성분으로부터 예컨대 종래의 기법에 의해 분리됨을 의미한다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포유류"는 설치류(즉, 마우스, 래트 또는 기니피그), 원숭이, 고양이, 개, 소, 말, 돼지 또는 인간을 의미한다. 일부 구현예에서, 포유류는 인간이다.

[0072] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은, 합리적인 의학적 판단 범위 내에서, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투약 형태를 의미한다. 일부 구현예에서, "약제학적으로 허용 가능한"은, 동물, 보다 특히 인간에서 사용하기 위한 것으로 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약적 또는 다른 일반적으로 인식된 약전에 나열된 것을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "이를 필요로 하는"은, 대상체가 특정 방법 또는 치료에 대한 필요성을 갖는 것으로 식별되었음을 의미한다. 일부 구현예에서, 식별은 임의의 진단 수단에 의한 것일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법 및 치료에서, 대상체는 이를 필요로 할 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "정제된"은, 단리된 경우, 단리물이 상기 단리물의 중량에 의해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 본원에 기재된 화합물을 함유함을 의미한다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같이, 상호교환적으로 사용되는 용어 "대상체," "개체" 또는 "환자"는 포유류, 예컨대 마우스, 래트, 다른 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말 또는 영장류, 예컨대 인간을 포함한 임의의 동물을 의미한다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "실질적으로 단리된"은, 화합물이 형성되거나 검출되는 환경으로부터 적어도 부분적으로 또는 실질적으로 분리된 화합물을 의미한다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 어구 "치료적 유효량"은, 연구자, 수의학자, 의학 박사 또는 다른 임상의에 의해 조직, 시스템, 동물, 개체 또는 인간에서 추구되고 있는 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 화합물 또는 약제학적 작용제의 양을 의미한다. 치료 효과는 치료받는 장애 또는 요망되는 생물학적 효과에 따라 다르다. 이와 같이, 치료 효과는 장애와 연관된 증상의 중증도의 저하 및/또는 장애의 진행의 저해(부분 또는 완전), 또는 장애 또는 부반응의 향상된 치료, 치유, 예방 또는 소실일 수 있다. 치료 반응을 유도하는 데 필요한 양은 대상체의 연령, 건강, 크기 및 성별에 기초하여 결정될 수 있다. 최적의 양 또한, 치료에 대한 대상체의 반응의 모니터링에 기초하여 결정될 수 있다.

[0077] **B. 마커**

[0078] 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커는 단독으로 또는 다양한 조합으로 사용하기 위해 제공되어 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정한다. 하기에서 상세히 기재된 바와 같이, 예시적인 구현예는 표 2에 제공된 마커를 포함한다.

표 2

표 2: 백혈구-유래 세포성 하위집단을 평가하기 위한 유세포분석 패널

[0079]

표면 마커	클론	역할
CD45	104	백혈구 공통 항원
CD11b	M1/70	단핵구/과립구 계통 마커
MHCII	M5/114.15.2	항원-제시(염증성 세포)
Ly6C	HK1.4	전-염증성 과립구 마커
Ly6G	1A8	호중구 마커
CD86	GL-1	대식세포, 수지상 세포, T 세포, B 세포의 활성화
CD206	C068C2	만노스 수용체(항-염증성 대식세포/수지상 세포)
CD19	500A2	Pan-B 세포 마커
CD38	90	활성화된 림프구, 형질아세포
CD3	6D5	Pan-T 세포 마커
CD23	B3B4	B-세포 활성화(성숙한 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 여포 수지상 세포, 및 혈소판 상에서의 제시)

[0080] 표 2는 파버병을 갖지 않는 대상체로부터의 시료로부터 파버병을 갖는 대상체로부터 수득된 시료를 구분하는 데 유용한 11 가지 마커를 나열한다.

[0081] 일부 구현예에서, 표 2로부터의 하나 이상의 마커는 대상체가 파버병을 갖는지 결정하거나 대상체가 파버병을 갖는 가능성을 결정하기 위해 단독으로 또는 다양한 조합으로 사용하고자 제공된다. 일부 구현예에서, 표 2로부터의 하나 이상의 마커는 대상체가 산 세라미다제 결핍, 지방육아종증, 및/또는 세라마이드-유도 만성 염증성 상태를 갖는지 결정하는 데 유용하다.

[0082] 일부 구현예에서, 표 2에 나열된 하나 이상의 마커는 파버병이 발병할 위험에 있는 대상체를 식별하는 데 유용하다. 일부 구현예에서, 표 2에 나열된 하나 이상의 마커는 산 세라미다제 결핍, 지방육아종증, 및/또는 세라마이드-유도 만성 염증성 상태의 위험에 있는 대상체를 식별하는 데 유용하다. 일부 구현예에서, 표 2에 나열된 하나 이상의 마커는 대상체가 파버병을 갖는지 결정하기 위해 단독으로 또는 다양한 조합으로 사용하고자 제공된다.

[0083] 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커 세트는 대상체가 파버병을 갖는지 결정하기 위해 단독으로 또는 다양한 조합으로 사용하고자 제공된다. 하기에서 상세히 기재된 바와 같이, 예시적인 구현예는 표 3에 제공된 마커 세트를 포함한다. 마커 세트는 유세포분석 검정법에서 표 2에 나열된 특이적인 마커를 발현하는 집단을 식별하기 위해 게이팅(gating) 전략을 사용하여 식별되었다.

표 3

표 3

[0084]

마커 세트	세포 유형
$CD11b^{+}Ly6G^{+}$	호중구
$SSC^{mid}FSC^{mid}$(크기)	벌크 단핵구
$MHCII^{-}CD11b^{hi}$	활성화된 단핵구
$CD11b^{+}CD206^{+}$	항-염증성 mΦ& DCs
$MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$	전-염증성 mΦ & DCs
$MHCII^{-}CD11b^{mid}CD23^{+}$	활성화된 전-염증성 mΦ & DCs
$MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$	활성화된 전-염증성 mΦ & DCs
$CD11b^{+}CD38^{+}$	전-염증성 mΦ & DCs
$CD19^{+}CD38^{+}$	활성화된 B 세포(PBs)
$CD19^{-}CD3^{+}$	총 T 세포

[0085] 일부 구현예에서, 방법은 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하기 위해 대상체로부터의 시료에서 표 3에 나열된 적어도 하나의 마커 세트의 수준을 검출하는 단계를 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, 방법은 대상체가 파버병을 갖는지 결정하는 단계, 표 3에 나열된 마커 세트로부터 N개의 마커 세트를 갖는 마커 패널을 형성하는 단계, 및 대상체로부터의 시료에서 패널의 각각의 마커 세트의 수준을 검출하는 단계를 포함하고, 여기서, N은 적어도 1이다. 일부 구현예에서, N은 적어도 2이거나, N은 적어도 3이거나, N은 적어도 4이거나, N은 적어도 5이거나, N은 5이거나, N은 6이거나, N은 7이거나, N은 8이거나, N은 9이거나, N은 10이다. 일부 구현예에서, 방법은 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, $SSC^{mid}FSC^{mid}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}$, $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$, $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$, $CD11b^{+}CD38^{+}$, $CD19^{+}CD38^{+}$, $CD11b^{+}CD206^{+}$, $MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$로부터 선택되는 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 10개의 마커 세트의 수준을 검출하여, 대상체가 파버병을 갖는지 결정하는 단계를 포함한다.

[0087] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0088] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0089] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}CD38^{+}$+의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0090] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 낮은 $CD11b^{+}CD206^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0091] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0092] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0093] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조

군 수준보다 낮은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0094] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$ 및/또는 $MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0095] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 $CD19^{+}CD38^{+}$ 및 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 대조군 수준보다 높은 $CD19^{+}CD38^{+}$의 수준 및/또는 대조군 수준보다 높은 $CD19^{-}CD3^{+}$의 수준은 대상체가 파버병을 가짐을 나타낸다.

[0096] 본원에서 식별된 마커는 파버병을 효과적으로 식별하는 데 사용될 수 있는 마커의 하위세트 또는 패널에 대한 많은 선택을 제공한다. 본원에서 식별된 마커는 산 세라미다제 결핍, 지방육아종증, 및/또는 세라마이드-유도 만성 염증성 상태를 효과적으로 식별하는 데 사용될 수 있는 마커의 하위세트 또는 패널에 대한 많은 선택을 제공한다. 적절한 수의 이러한 마커의 선택은 선택되는 마커의 특정 조합에 따라 달라질 수 있다. 또한, 본원에 기재된 임의의 방법에서, 분명하게 나타낸 경우를 제외하고는, 마커의 패널은 표 2 또는 표 3에 제시되지 않은 부가적인 마커를 포함할 수 있다.

[0097] 일부 구현예에서, 방법은 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하기 위해 대상체로부터의 시료에서 표 2에 나열된 적어도 하나의 마커의 수준을 검출하는 단계를 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터의 시료에서 표 3에 나열된 적어도 하나의, 적어도 2개의, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10개의 마커 세트의 수준을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 적어도 하나의 마커의 수준은 대상체가 파버병을 갖는지 나타낸다.

[0099] 일부 구현예에서, 마커는 산 세라미다제 결핍이 없는 개체와 비교하여 산 세라미다제 결핍을 갖는 개체에서 상이한 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, 마커는 지방육아종증이 없는 개체와 비교하여 지방육아종증을 갖는 개체에서 상이한 수준으로 존재한다. 일부 구현예에서, 마커는 세라마이드-유도 만성 염증성 상태가 없는 개체와 비교하여 세라마이드-유도 만성 염증성 상태를 갖는 개체에서 상이한 수준으로 존재한다. 개체에서 마커의 차별적인 수준의 검출은 예를 들어, 개체가 파버병을 갖는지 결정할 수 있게 하는데 사용될 수 있다.

[0100] 일부 구현예에서, 혈액 시료를 이용하는 방법이 비-침습적이기 때문에, 본원에 기재된 임의의 마커는 파버병의 발병에 대해 개체를 모니터링하거나 파버병 또는 산 세라미다제 결핍을 발병시킬 위험에 있는 개체를 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 산 세라미다제 결핍을 보다 조기에 검출함으로써, 의학적 개입 또는 치료, 예컨대 rhAC를 이용한 치료는 더 효과적일 수 있다.

[0101] 또한, 일부 구현예에서, 개체에서 시간 경과에 따른 하나 이상의 마커의 차별적인 발현 수준은 특정 치료 요법에 대한 개체의 반응을 나타낼 수 있다. 그러므로, 본 발명의 일 구현예는 파버병 치료 요법의 효능을 결정하기 위한 방법을 수반한다. 일부 구현예에서, 추적조사 모니터링 동안 하나 이상의 마커의 발현의 변화는 특정 치료가 효과적임을 나타낼 수 있거나 치료 요법이 조정되어야 함을 시사할 수 있다. 하나 이상의 마커의 발현 수준은 치료 요법을 시작하기 전에, 및/또는 치료 요법 동안에 결정될 수 있다.

[0102] 독립형(stand-alone) 진단 시험으로서 마커 수준을 시험하는 것 외에도, 마커 수준은 또한, 다른 파버병 스크리닝 또는 진단 방법과 함께 수행될 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 마커를 사용하는 방법은 파버병에 대해 보다 공격적인 치료, 보다 빈번한 추적조사 스크리닝 등을 시행하기 위한 의학적 및 경제적 정당화를 용이하게 할 수 있다. 마커는 또한, 파버병을 발병시킬 위험에 있지만 파버병으로 진단받은 적이 없는 개체에서, 진단 시험에서 이들이 질병을 발병시킬 경향이 있는 것으로 나타난다면 치료를 시작하는 데 사용될 수 있다. 다른 파버병 진단 방법과 함께 마커 수준을 시험하는 것 외에도, 마커에 관한 정보 또한, 다른 유형의 데이터, 특히 파버병에 대한 개체의 위험도를 나타내는 데이터와 함께 평가될 수 있다.

[0103] **C. 마커의 검출**

[0104] 본원에 기재된 마커에 대한 마커 수준은 임의의 여러 가지 기지의 분석 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 일 구현예에서, 마커 수준은 캡처 시약을 사용하여 검출된다. 다양한 구현예에서, 캡처 시약은 상기 캡처 시약이 고체 지지체 상에 고정되어 있는 한편, 용액 중 마커에 노출될 수 있거나 마커에 노출될 수 있다. 다른 구현예에서, 캡처 시약은 고체 지지체 상의 2차 특징부와 반응성인 특징부를 함유한다. 캡처 시약은 수행되는 분석의 유

형에 기초하여 선택된다. 일부 구현예에서, 캡처 시약은 항체, 저분자, F(ab')2 단편, 단일 사슬 항체 단편, Fv 단편, 단일 사슬 Fv 단편, 리간드-결합 수용체, 사이토카인 수용체 및 합성 수용체, 및 이들의 변형 및 단편을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, 캡처 시약은 항체를 포함한다.

[0105] 일부 구현예에서, 마커 수준은 생물학적 시료 내 마커로부터 직접적으로 검출된다. 일부 구현예에서, 마커는 생물학적 시료에서 2개 이상의 마커의 동시적인 검출을 가능하게 하는 멀티플렉스드(multiplexed) 포맷을 사용하여 검출된다.

[0106] 일부 이러한 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터의 시료 또는 시료의 일부를 적어도 하나의 캡처 시약과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 각각의 캡처 시약은 마커 또는 마커 세트에 특이적으로 결합하고 이의 수준이 검출된다.

[0107] 나아가, 일부 구현예에서, 생물학적 시료는 다수의 개체로부터 생물학적 시료를 얻고 이들 시료를 풀링(pooling)하거나, 각각의 개체의 생물학적 시료의 분취물을 풀링함으로써 유래될 수 있다. 풀링된 시료는 단일 개체로부터의 시료에 대해 본원에 기재된 바와 같이 처리될 수 있고, 예를 들어, 불량한 예후가 풀링된 시료에서 확립된다면, 각각의 개별적인 생물학적 시료는 어떤 개체(들)가 파버병을 갖는지 결정하기 위해 재시험될 수 있다.

[0108] 일부 구현예에서, 형광 태그는 마커/캡처 시약 복합체의 구성성분을 표지하여 마커 수준의 검출을 가능하게 하는 데 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 형광 표지는 기지의 기법을 사용하여 본원에 기재된 임의의 마커에 특이적인 캡처 시약에 컨쥬게이션(conjugate)될 수 있고, 그 후에 형광 표지는 상응하는 마커 수준을 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0109] 일부 구현예에서, 형광 표지는 형광 염료 분자이다. 일부 구현예에서, 형광 염료 분자는, 인돌륨 고리의 3-탄소 상의 치환기가 화학적 반응성 기 또는 컨쥬게이션된 성분을 함유하는 적어도 하나의 치환된 인돌륨 고리 시스템을 포함한다. 일부 구현예에서, 염료 분자는 예를 들어, AlexaFluor 488, AlexaFluor 532, AlexaFluor 647, AlexaFluor 680 또는 AlexaFluor 700과 같은 AlexFluor 염료 분자(Thermo Fischer Scientific)를 포함한다. 일부 구현예에서, 염료 분자는 예를 들어, BV421, BV510, BV605, BV 650 또는 BV711과 같은 BD Horizon Brilliant™ 염료 분자(BD Sciences)를 포함한다. 일부 구현예에서, 염료 분자는 Cy5 또는 Cy7을 포함한다. 일부 구현예에서, 염료 분자는 예를 들어, 2 가지의 상이한 AlexaFluor 분자와 같은 제1 유형 및 제2 유형의 염료 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 염료 분자는 제1 유형 및 제2 유형의 염료 분자를 포함하고, 2 가지의 염료 분자는 상이한 방출 스펙트럼을 가진다.

[0110] 형광은 광범위한 검정법 포맷과 상용성인 여러 가지 기기 장치를 이용하여 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 마커에 대한 마커 수준은 싱글플렉스(singleplex) 또는 멀티플렉스드 면역검정법, 조직학적/세포학적 방법 등을 포함한 임의의 분석 방법을 사용하여 검출될 수 있다. 면역검정법 방법은 항체와 이의 상응하는 표적 또는 분석물의 반응에 기초하고, 특정 검정법 포맷에 따라 시료 내 분석물을 검출할 수 있다. 면역-반응성에 기초한 검정법 방법의 특이성 및 선택성을 향상시키기 위해, 모노클로날 항체 및 이의 단편은 이들의 특이적인 에피토프 인식 때문에 종종 사용된다. 폴리클로날 항체 또한, 모노클로날 항체와 비교하여 표적에 대한 이들 폴리클로날 항체의 증가된 친화성 때문에 다양한 면역검정법에서 성공적으로 사용되어 왔다. 면역검정법은 광범위한 생물학적 시료 매트릭스와 함께 사용하기 위해 디자인되었다. 면역검정법 포맷은 정성적, 반-정량적 및 정량적 결과를 제공하기 위해 디자인되었다.

[0111] 유세포분석 방법 또한, 마커의 검출에 사용될 수 있다. 유세포분석을 수행하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 일반적으로, 세포, 바람직하게는 혈액 세포는 항체와 함께 인큐베이션된다. 바람직한 구현예에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 모노클로날 항체가 형광 마커로 표지되는 것이 더 바람직하다. 항체가 형광 마커로 표지되지 않는다면, 제2 항체는 제1 항체와 면역반응성이고 형광 마커를 함유한다. 과량의 또는 비-결합된 항체가 제거되도록 보장하기 위한 충분한 세척 후, 세포는 유세포분석 준비가 된다. 유세포분석은 시료 제조, 획득 및 분석 사이에서 짧은 소요 시간(turnaround time)을 제공하며, 개별적인 세포 하위세트(매우 드문 하위세트를 포함함)의 정확한 열거(enumeration)를 가능하게 하고, 상세한 분자 표현형화(phenotyping)의 기회를 제공한다.

[0112] **D. 키트**

[0113] 본원에 기재된 마커의 임의의 조합은 예컨대 본원에 개시된 방법을 수행하는 데 사용하기 위해 적합한 키트를 사용하여 검출될 수 있다. 더욱이, 임의의 키트는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 검출 가능한 표지, 예컨대 형광 모이어티 등을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 생물학적 시료에서 하나 이상의 마커를 검

출하기 위한 하나 이상의 캡처 시약(예컨대 예를 들어, 적어도 하나의 항체)을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 생물학적 시료가 수득된 개체가 파버병을 갖고 있는지 예측하기 위한 하나 이상의 소프트웨어 또는 컴퓨터 프로그램 제품을 선택적으로 포함한다. 대안적으로, 하나 이상의 컴퓨터 프로그램 제품 이외에, 인간에 의해 상기 단계를 수동적으로 수행하기 위한 하나 이상의 설명서가 제공될 수 있다. 상기 키트는 또한, 장치 및 시약을 사용하며, 시료를 취급하고, 데이터를 분석하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 나아가, 상기 키트는 생물학적 시료를 분석하고 분석 결과를 보고하기 위해 컴퓨터 시스템 또는 소프트웨어와 함께 사용될 수 있다. 상기 키트는 또한, 생물학적 시료를 가공하기 위해 하나 이상의 시약(예를 들어, 가용화 완충제, 세제, 세척제 또는 완충제)을 함유할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 키트는 또한, 예를 들어, 완충제, 차단제(blocking agent), 항체 캡처 작용제, 양성 대조군 시료, 음성 대조군 시료, 소프트웨어 및 정보, 예컨대 프로토콜, 가이드라인 및 기준 데이터를 포함할 수 있다.

[0114] **E. 치료 방법**

[0115] 일부 구현예에서, 대상체가 파버병(또는 산 세라마이드 결핍)을 갖는지 결정한 후, 대상체는 질병의 악화를 지연시키거나 예방하기 위해 치료 요법을 받는다. 일부 구현예에서, 대상체에게 치료제, 예컨대 rhAC가 주어진다. rhAC를 이용하여 파버병을 치료하는 예시적인 방법은 2018년 1월 12일에 출원된 국제 출원 PCT/US18/13509 및 문헌[He et al., "Enzyme replacement therapy for Farber disease: Proof-of-concept studies in cells and mice," BBA Clin. 2017 Feb 13; 7:85-96 (He et al., 2017)]에 기재되어 있으며, 이들은 그 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0116] 일부 구현예에서, 파버병을 모니터링하는 방법이 제공된다. 당업자에게 알려진 임의의 방법은 질병 상태 및 치료법의 효과성을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 질병 상태의 임상적 모니터는 파버병과 연관된 것으로 알려진 세라마이드 수준, 체중, 관절 길이, 염증 또는 임의의 다른 임상적 표현형을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0117] 일부 구현예에서, 대상체가 파버병을 갖고 있는지 결정하는 본 방법은 시점 0에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체에서 질병의 진행을 모니터링하기 위해 시점 1, 및 선택적으로 시점 2, 및 선택적으로 시점 3 등에서 다시 수행된다. 일부 구현예에서, 상이한 마커는 개체의 질병의 현재 상태에 따라 및/또는 질병이 진행하는 것으로 여겨지거나 예측되는 속도에 따라 상이한 시점에서 사용된다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다," "치료되는," 또는 "치료하는"은 치료적 치료와 예방적 조치 둘 모두를 의미하며, 여기서, 그 목적은 요망되지 않는 생리학적 질환, 장애 또는 질병을 늦추거나(약화시키거나) 유익한 또는 요망되는 임상 결과를 수득하는 것이다. 예를 들어, 유익한 또는 요망되는 임상 결과는 증상의 경감; 질환, 장애 또는 질병의 정도의 축소; 질환, 장애 또는 질병의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태; 질환, 장애 또는 질병 진행의 개시의 지연 또는 서행(slowing); 검출 가능하거나 검출 불가능하든지 간에 질환, 장애 또는 질병 상태의 개선 또는 차도(부분적이거나 전체적이든 간에); 환자에 의해 필수적으로 분간 가능하지는 않은, 적어도 하나의 측정 가능한 신체적 매개변수의 개선; 또는 질환, 장애 또는 질병의 증강 또는 향상을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 그러므로, "파버병의 치료" 또는 "파버병을 치료하는"은 파버병 또는 본원에 기재된 다른 질환과 연관된 임의의 1차 현상 또는 2차 증상을 경감시키거나 개선하는 활성을 의미한다.

[0119] 나아가, 명료성을 위해 개별 구현예의 맥락에서 기재된 본원에 기재된 소정의 특징부 또한, 단일 구현예에서 조합되어 제공될 수 있는 것으로 이해된다. 대조적으로, 간결성을 위해 단일 구현예의 맥락에서 기재된 다양한 특징부 또한, 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 제공될 수 있다.

[0120] 다양한 약제학적 조성물은 본원에 기재되고, 환자 및 의사의 선호도에 기초하여 사용될 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 용액이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 rhAC를 포함하는 세포 조건화된 배지를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 조건화된 배지"는 rhAC를 발현하는 세포를 배양하기 위해 사용되어 왔고 단백질이 배지 내로 분비된 다음 상기 단백질이 배지로부터 단리되거나 정제되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, 배지는 대상체를 치료하는 데 사용된다. 상기 배지는 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 질환, 증상 또는 장애를 치료하기 위해 대상체의 피부에 적용될 수 있다.

[0121] 본원에 기재된 투여 경로 외에도, 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 대상체의 피부와 접촉시킴으로써 투여된다. 일부 구현예에서, 투여는 비경구 투여이다. 일부 구현예에서, 투여는 약제학적 조성물을 대상체에게 주사하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여는 복강내 주사 또는 정맥내 주사이다.

[0122] 일부 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 파버병을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서, 상기 방법은 세

포에서 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 발현시키는 단계; 발현된 rhAC를 상기 세포로부터 단리하는 단계; 및 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 유효량의 단리된 발현 rhAC를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0123] 일부 구현예에서, 세포에서 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 발현시키는 것은 rhAC를 인코딩하는 벡터를 세포 내로 이전하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터는 rhAC를 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 본원에 기재된 바와 같은 분자 또는 rhAC 폴리펩타이드 또는 이의 상동체를 인코딩하는 임의의 다른 핵산 분자이며, 이는 본원에서 보다 상세히 기재된다. 일부 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 예를 들어, 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 DNA 바이러스 벡터, 예컨대 아데노바이러스, AAV 등일 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 구현예에서, 벡터는 rhAC에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적(constitutive) 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 SV40 프로모터, CMV 프로모터, EF1 알파 프로모터 또는 이들의 임의의 조합, 또는 포유류 세포에서 활성인 임의의 다른 프로모터이다.

[0124] 일부 구현예에서, 벡터는 세포 내로 형질감염되거나 감염된다. 벡터를 세포에 도입하는 방법은 중요하지 않고, 임의의 방법은 세포에서 rhAC 폴리펩타이드의 충분한 발현을 제공하는 데 사용될 수 있다.

[0126] 일부 구현예에서, 세포는 포유류 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 인간 세포가 아니다. 일부 구현예에서, 세포는 햄스터 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈청-무함유에서 성장되거나 혈청 환경이 실질적으로 없을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 CHO-K1 세포로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포는 뮤린 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 뮤린 골수종 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 NSO 세포이다. 일부 구현예에서, 투여되는 유효량은 본원, 상기 및 하기에 기재된 바와 같다.

[0127] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같이 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조성물은 대상체에게 경구로, 흡입에 의해, 비내 설치에 의해, 국소적으로, 경피로, 비경구로, 피하로, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사, 흉막강내로, 복강내로, 경막내로, 또는 점막에의 적용에 의해 투여된다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "rhAC"는 재조합 인간 산 세라미다제를 지칭한다. 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 포함한다.

[0129] 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 1의 상동체인 단백질인 단백질이다. 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 2의 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 3의 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, rhAC는 SEQ ID NO: 4의 핵산 분자에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 서열은 GenBank 기탁번호 NM_177924.3 또는 NM_177924.4에서 정의된 바와 같고, 이들은 각각 그 전문이 참조에 의해 포함된다. 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, 또는 SEQ ID NO: 4에 제시된 완전 서열일 수 있거나, 단순히 상기 서열의 코딩 영역일 수 있다. 코딩 영역은 예를 들어, SEQ ID NO: 2의 뉴클레오타이드 313 내지 1500 또는 SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4에서 확인된 상응하는 코딩 영역일 수 있을 것이다. 그러나, 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 유전자 코드는 축퇴되고, 따라서, 다른 코돈은 개시된 것으로부터 벗어나지 않으면서 동일한 단백질을 인코딩하는 데 사용될 수 있다. 아미노산 서열은 알려져 있기 때문에, 아미노산 서열을 인코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열이 허용 가능하다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오타이드 313 내지 375에 의해 인코딩되는 아미노산 서열이다. 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 1~21의 신호 펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 신호 펩타이드, 예컨대 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 1~21의 신호 펩타이드를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 신호 펩타이드는 효소가 이의 상이한 하위단위로 가공되는 번역-후 과정 동안 제거된다. 일부 구현예에서, 뉴클레오타이드 서열은, 단백질이 발현되고 있는 세포에 대해 최적화된 코돈이다. 일부 구현예에서, 단백질은 알파-하위단위, 베타-하위단위 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 생성되는 단백질은 SEQ ID NO: 1의 아미노산 잔기 22~142, 45~139, 134~379, 143~395, 또는 1~395의 펩타이드를 포함한다. 펩타이드는 효소를 형성하기 위한 상이한 서열의 단일 단백질 또는 폴리펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질은 아미노산 잔기 1~21이 없다. 이들 영역은 단일 뉴클레오타이드 서열 또는 개별 뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열들의 조합에 의해 인코딩될 수 있다. 본원에서 논의된 바와 같이, 단백질을 인코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열이 사용될 수 있고, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 또는 SEQ ID NO: 4로서 본원에 기재된 서열에 제한되지 않는다.

[0130] 일부 구현예에서, rhAC는 산 세라미다제(AC) 활성을 갖지만, 임의의 검출 가능한 산 스핑고미엘리나제 활성을 갖지 않는다. 산 스핑고미엘리나제 활성은 예를 들어, 열 불활성화에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 20160038574를 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 포함된다. 열 불활성화는 또한, rhAC 조제물로부터 다른 오염성 단백질을 제거할 수 있다.

[0131] 용어 "상동체"는 기준 서열과 80% 내지 100% 서열 동일성을 갖는 단백질 서열을 지칭한다. 2개의 펩타이드 사슬 사이의 동일성 퍼센트는 벡터 NTI v.9.0.0의 AlignX 모듈(Invitrogen Corp., 미국 캘리포니아주 칼즈배드 소재)의 디폴트 설정을 사용하는 페어와이즈 정렬(pair wise alignment)에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동체는 본원에 기재된 서열, 예컨대 SEQ ID NO: 1과 적어도 또는 약 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 동일성을 가진다. 일부 구현예에서, 대상체에게 전달되는 단백질은 본원에 기재된 서열과 비교하여 보존적 치환을 갖는다. 비제한적인 예시적인 보존적 치환은 표 4에 제시되고, 개시된 주제의 범위 내에 포괄된다. 치환은 또한, 효소의 기능, 예를 들어, 안정성 또는 효소 활성을 향상시키도록 이루어질 수 있다. 보존적 치환은 이러한 변형이 이루어지는 분자와 유사한 기능적 및 화학적 특징을 갖는 분자를 생성할 것이다. 예시적인 아미노산 치환은 하기 표 4에 제시된다.

표 4

표 4: 예시적인 보존적 치환:

[0132]

원래의 잔기	예시적인 보존적 치환
Ala	Val, Leu, Ile
Arg	Lys, Gln, Asn
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Gly	Pro, Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys	Arg, Gln, Asn
Met	Leu, Phe, Ile
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro	Ala
Ser	Thr, Ala, Cys
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

[0133] 본원에 사용된 바와 같이, "불활성 산 세라미다제," "불활성 AC," 또는 "불활성 산 세라미다제 전구체," "불활성 AC 전구체," 또는 (AC 예비단백질(preprotein))은 활성 형태로의 자가단백분해성 절단을 겪지 않은 AC 전구체 단백질을 지칭한다. 본 발명의 이러한 양태 및 모든 양태의 재조합 산 세라미다제에 사용하기에 적합한 불활

성 AC 전구체 및 활성 AC는 치료를 받는 조직, 세포 및/또는 대상체에게 상동성(즉, 동일한 종으로부터 유래됨) 또는 이종성(즉, 상이한 종으로부터 유래됨)일 수 있다. 산 세라미다제(예를 들어, AC) 전구체 단백질은 활성 형태(α-하위단위 및 β-하위단위로 이루어짐)로의 자가단백분해성 절단을 겪는다. 인간 AC 절단 및 활성화의 기전은 (Shtraizent, 2008)에서 보고된다. 이는 세포내 환경에 의해, 그리고 종에 걸쳐서 세라미다제 전구체 단백질의 절단 부위에서의 고도로 보존된 서열에 기초하여 촉진되고, 모두 다는 아니지만 대부분의 세포 유형에서 발생하는 것으로 기대된다. 그러므로, 본원에 사용된 바와 같은 세라미다제는 활성 세라미다제 단백질과 세라미다제 전구체 단백질 둘 모두를 포함하고, 여기서, 세라미다제 전구체 단백질은 자가단백분해성 절단을 통해 활성 세라미다제 단백질로 전환된다. 전구체 단백질이 관심 세포에 의해 얻어지고 이에 의해 활성 세라미다제로 전환되는 구현예, 뿐만 아니라 전구체 단백질이 상이한 세포 또는 작용제(예를 들어, 배양 배지에 존재함)에 의해 활성 세라미다제로 전환되는 구현예 둘 모두가 고려된다.

[0134] 본 발명의 이러한 양태 및 모든 양태에 사용될 수 있는 활성 AC 및 불활성 AC 전구체 단백질은 제한 없이 US 2016/0038574의 표 1에 제시된 것들을 포함하며, 이 문헌의 내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

US 2016/0038574 의 표 1(그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함됨)

표 1

예시적인 산 세라미다제 계통 구성원

호모 사피엔스		*캐노르합디티스 엘레간스*	
UniProt	Q13510, Q9H715, Q96AS2	UniProt	O45686
OMIM	228000	IntAct	O45686
NCBI Gene	427	NCBI Gene	173120
NCBI RefSeq	NP_808592, NP_004306	NCBI RefSeq	NP_493173
NCBI RefSeq	NM_177924, NM_004315	NCBI RefSeq	NM_060772
NCBI UniGene	427	NCBI UniGene	173120
NCBI Accession	Q13510, AAC73009, AAC50907	NCBI Accession	O45686, CAB05556
무스 무스쿨루스		*다니오 레리오*	
UniProt	Q9WV54, Q3U8A7, Q78P93	UniProt	Q5XJR7
NCBI Gene	11886	NCBI Gene	450068
NCBI RefSeq	NP_062708	NCBI RefSeq	NP_001006088
NCBI RefSeq	NM_019734	NCBI RefSeq	NM_001006088
NCBI UniGene	11886	NCBI UniGene	450068
NCBI Accession	AK151208, AK034204	NCBI Accession	AAH83231, CB360968
갈루스 갈루스		*라투스 노르베기쿠스*	
UniProt	Q5ZK58	UniProt	Q6P7S1, Q9EQJ6
NCBI Gene	422727	NCBI Gene	84431
NCBI RefSeq	NP_001006453	NCBI RefSeq	NP_445859
NCBI RefSeq	NM_001006453	NCBI RefSeq	NM_053407
NCBI UniGene	422727	NCBI UniGene	84431
NCBI Accession	CAG31885, AJ720226	NCBI Accession	AAH61540, AF214647
판 트로글로디테스			
NCBI Gene	464022		
NCBI RefSeq	XP_519629		
NCBI RefSeq	XM_519629		
NCBI UniGene	464022		

[0135]

[0136] 본 발명의 이러한 양태 및 모든 양태에 사용될 수 있는 활성 AC 및 불활성 AC 전구체 단백질은 제한 없이, 미국 공개 특허 출원 US 2016/0038574 A1로서 공개된 문헌[Schuchman, E. H. (발명자), Icahn School of Medicine at Mount Sinai (출원인), 2016, February 11, Therapeutic Acid Ceramidase Compositions And Methods Of Making And Using Them]의 표 1에 제시된 것들을 포함한다.

[0137] 일 구현예에서, 활성화된 형태의 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)는 파버병의 치료에 이용된다. 활성화된 rhAC의 알파 하위단위 및 베타 하위단위는 이황화 결합에 의해 접합된다. 분자는 rhAC를 발현하는 DNA 플라스미드 벡터로 형질감염된 CHO-M 세포로부터 유래된 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)이다. 일 구현예에서, rhAC는 UniProtKB 코드: Q13510에 기초한다.

[0138] 일 구현예에서, 재조합적으로 생성된 산 세라미다제(rhAC)는 재조합적으로 생성된 산 세라미다제를 i) 양이온 교환 크로마토그래피; ii) 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC); 및 iii) 음이온 교환 크로마토그래피로부터

선택되는 적어도 2개의 크로마토그래피 단계를 받게 하는 단계; 및 용액 내 상기 재조합적으로 생성된 산 세라미다제를 하나 이상의 바이러스 불활성화 단계를 받게 하는 단계를 포함하는 과정에 의해 적어도 95% 활성화된 형태의 순도까지 정제되고, 여기서, rhAC 용액은 pH 3.7 이하까지 적정된다. 일 구현예에서, rhAC의 단백질 서열은 SEQ ID NO: 1에 상응한다.

[0139] 일 구현예에서, rhAC의 정제는 2018년 9월 24일에 출원된 PCT/2018/052463에 개시된 과정에 따라 수행될 수 있으며, 이 문헌은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다. RVT-801rhAC의 치료 효과는 중증 파버병의 뮤린 모델(He, et al, 2017)에서 확립되었고, 축적된 세라마이드의 병행되는 감소와 더불어 조직병리학적 및 면역학적 성과에 미치는 긍정적인 영향을 기재하는 종점과 함께 다수의 연구에 걸쳐 특징화되었다.

[0140] 일부 구현예에서, 정제된 재조합적으로 생성된 산 세라미다제는 적어도 90%, 93%, 95%, 98% 또는 99%의 순도, 또는 100%의 순도를 가진다.

[0141] 일부 구현예에서, 정제된 재조합적으로 생성된 산 세라미다제는 검출 가능한 산 스핑고미엘리나제 활성을 갖지 않는다.

[0142] 일부 구현예에서, 재조합적으로 생성된 산 세라미다제의 산 스핑고미엘리나제 활성은 열의 사용 없이 제거된다.

[0143] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "~와 조합된"은, 기재된 작용제가 혼합물에서 함께, 단일 작용제로서 병행하여 또는 단일 작용제로서 임의의 순서에서 순차적으로 대상체에게 투여될 수 있음을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "~와 조합된"은, 기재된 작용제가 혼합물에서 함께, 단일 작용제로서 병행하여 또는 단일 작용제로서 임의의 순서에서 순차적으로 대상체에게 투여될 수 있음을 의미한다.

[0144] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서, 단백질은 세포로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소 세포, "CHO 세포"이다. 본원에 기재된 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 본원에 기재된 적어도 하나의 단백질을 인코딩하는 게놈 DNA 또는 cDNA, 또는 RNA(예를 들어, mRNA)일 수 있다. cDNA의 사용은, 숙주 세포에 적절한 유전자 발현 요소가 요망되는 단백질의 합성을 달성하기 위해 유전자와 조합되는 것을 필요로 한다. cDNA 서열의 사용은, 적절한 RNA 스플라이싱 시스템이 결여된 박테리아 또는 다른 숙주에서 상기 cDNA 서열이 발현될 수 있는 게놈 서열(인트론을 함유함)에 걸쳐 유리할 수 있다. 당업자는 단백질을 발현시키기 위한 최상의 시스템을 결정할 수 있다.

[0145] 일부 구현예에서, 단백질은 미국 특허 출원 공개 20160038574에 따라 생성되며, 이러한 문헌은 그 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0146] 유전자 코드가 축퇴되기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하는 데 1개 초과의 코돈이 사용될 수 있다. 유전자 코드를 사용하여, 하나 이상의 상이한 올리고뉴클레오타이드는 식별될 수 있으며, 이들은 각각 본원에 기재된 아미노산 서열을 인코딩할 수 있을 것이다.

[0147] 파버병 또는 이와 연관된 질환을 치료하기 위해 대상체에게 투여되는 효소는 정제될 수 있다. 단백질과 관련하여 용어 "정제된"은 이의 천연 환경에서 분자와 화합되는 다른 물질이 실질적으로 없는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 정제된 단백질은, 이것이 유래되는 세포 또는 조직으로부터의 세포성 물질 또는 다른 단백질이 실질적으로 없다. 상기 용어는, 단리된 단백질이 분석되기에 충분히 순수하거나 적어도 70% 내지 80%(w/w) 순수한, 적어도 80% 내지 90%(w/w) 순수한, 90 내지 95% 순수하고; 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%(w/w) 순수한 조제물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 단백질은 세포, 예컨대 비제한적으로 CHO 세포로부터 정제된다.

[0148] *단백질을 포함하는 투여, 조성물 및 키트*

[0149] 일부 구현예에서, 본 방법은 치료적 또는 예방적 유효량의 본원에 기재된 하나 이상의 단백질을 파버병을 갖고 있거나 파버병을 갖고 있는 것으로 의심되는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0150] 대상체의 치료는 치료적 유효량의 본원에 기재된 단백질의 투여를 포함할 수 있다.

[0151] 단백질은 본원에 기재된 바와 같이 키트에 제공될 수 있다.

[0152] 단백질은 단독으로 또는 부가적인 치료제와 혼합하여 사용되거나 투여될 수 있다. 부가적인 치료제의 예는 산 스핑고미엘리나제의 저해제(예를 들어, 아미트립틸린(amitryptiline)(문헌[Becker et al., "Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide and Inflammation in Cystic Fibrosis," Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 42:716-724 (2010)], 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함됨) 및 세라마이드 신타제(synthase)의 저해제(예를 들어, 문헌[Shiffmann et al., "Inhibitors of Specific Ceramide

Synthases," Biochimie, 94:558-565 (2012)], 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함됨))를 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다. 부가적인 치료제는 또한, 미국 특허 출원 공개 20160038574에 기재된 세라미다제 혼합물일 수 있으며, 이는 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0153] 효소 대체 치료법(ERT)이 효과적일 수 있긴 하지만, AC 축적의 감소가 실증된 파버병에 대한 본 발명자들의 현재 연구에 제시된 바와 같이, 항체가 약물, 즉, 이의 효능을 감소시킬 수 있는 대체 효소에 대해 발달될 수 있다. 본원에서 본 발명자들은, 반복 투약이 양호하게 관용되며, 이는 질병의 증상의 감소를 초래하는 대체 효소, 특히 본원 및 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 20160038574에 기재된 방법에 따라 생성되는 효소의 반복 투여의 치료 요법을 지지함을 제시하였다.

[0154] 일부 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 파버병을 치료하는 방법은 유효량의 재조합 인간 산 세라미다제를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 약 10, 약 20 또는 약 30주, 1, 5, 10 또는 25년 또는 환자의 생애 동안 약 1주에 1회, 2, 3 또는 4주마다 1회, 또는 1개월에 1회 투여하는 단계를 포함한다.

[0155] 적합한 비히클 및 이들의 제제와 패키징은 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed., Troy, D. ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2005) Chapters 40 and 41)]에 기재되어 있다. 부가적인 약제학적 방법은 작용 기간을 조절하기 위해 이용될 수 있다. 조절 방출 조제물(controlled release preparation)은 중합체의 사용을 통해 화합물과 복합체화되거나 흡수하여 달성될 수 있다. 조절 방출 조제물에 의해 작용 기간을 조절하는 다른 가능한 방법은 중합체성 물질, 예컨대 폴리에스테르, 폴리아미노산, 하이드로겔, 폴리(락트산) 또는 에틸렌 비닐아세테이트 공중합체의 입자 내로 화합물을 혼입하는 것이다. 대안적으로, 이들 작용제를 중합체성 입자 내로 혼입하는 대신, 이들 물질을 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 계면(interfacial) 중합, 예를 들어, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트)-마이크로캡슐에 각각, 또는 콜로이드 약물 전달 시스템, 예를 들어, 리포좀, 알부민 미소구체, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐 또는 마크로에멀젼에 포집(entrap)시키는 것이 가능하다.

[0156] 예시적인 전달 장치는 비제한적으로, 네뷸라이저(nebulizer), 애터마이저(atomizer), 리포좀(능동 약물 전달 기법과 수동 약물 전달 기법 둘 모두를 포함함)(문헌[Wang et al., 1997, pH-sensitive immunoliposomes mediate target-cell-specific delivery and controlled expression of a foreign gene in mouse, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:7851-5); Bangham et al., 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Biol.* 13:238-52; 미국 특허 제5,653,996호로서 공개된 Hsu C.C. (발명자), Genentech, Inc. (양수인), 1997, August 5, *Method for preparing liposomes*; 미국 특허 제5,643,599호로서 공개된 Lee, K.-D., et al. (발명자들), President and Fellows of Harvard College and the University of Pennsylvania, *Intracellular delivery of macromolecules*; 미국 특허 제5,885,613호로서 공개된 Holland J.W. (발명자), The University of British Columbia, *Bilayer stabilizing components and their use in forming programmable fusogenic liposomes*; 미국 특허 제5,631,237호로서 공개된 Dzau, V. J, and Kaneda, Yasufumi (발명자), *Method for producing in vivo delivery of therapeutic agents via liposomes*; 및 미국 특허 제5,059,421호로서 공개된 Loughrey, et al. (발명자), The Liposome Company (양수인), *Preparation of targeted liposome systems of a defined size distribution*; Wolff et al., 1984, The use of monoclonal anti-Thy1 IgG1 for the targeting of liposomes to AKR-A cells in vitro and in vivo, *Biochim. Biophys. Acta* 802:259-73]), 경피 패치, 이식물, 이식 가능한 또는 주사 가능한 단백질 데폿(depot) 조성물, 및 주사기를 포함한다. 당업자에게 알려진 다른 전달 시스템 또한, 요망되는 기관, 조직 또는 세포로의 세라미다제의 요망되는 전달을 달성하기 위해 이용될 수 있다.

[0157] 일반적으로, 전신 용량의 단백질을 투여한다면, 약 1 ng/kg~100 ng/kg, 100 ng/kg~500 ng/kg, 500 ng/kg~1 μkg, 1 μkg /kg~100 μkg /kg, 100 μkg /kg~500 μkg /kg, 500 μkg/kg~1 mg/kg, 1 mg/kg~50 mg/kg, 50 mg/kg~100 mg/kg, 100 mg/kg~500 mg/kg(수혜자의 체중) 범위의 투약량의 단백질을 수혜자에게 제공하는 것이 바람직하지만, 더 낮거나 더 높은 투약량이 투여될 수 있다.

[0158] 일부 구현예에서, 투여되는 rhAC의 유효량은 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 10 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 10 mg/kg 내지 약 20 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 20 mg/kg 내지 약 30 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 30 mg/kg 내지 약 40 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 40 mg/kg 내지 약 50 mg/kg이다. 일부 구현예에서, 유효량은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg이다.

[0159] 일부 구현예에서, 파버병을 진단받은 대상체는 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg rhAC 또는 약 2 mg/kg 내지 약 5

mg/kg rhAC의 rhAC를 2주마다 투여받는다. 일 구현예에서, 투약량은 4주째에 1 mg/kg 또는 2 mg/kg으로부터 5 mg/kg까지 상승한다. 용량 수준이 개별 대상체에 의해 관용되지 않는다면, 해당 대상체에 대한 용량은 적절하다면, 2 mg/kg으로부터 1 mg/kg까지, 또는 5 mg/kg으로부터 2 mg/kg까지 감소될 수 있다. rhAC는 적어도 10, 20 또는 30주 동안 또는 대상체의 생애 동안 2주마다 투여될 수 있다. 하나의 예시적인 구현예에서, 대상체는 파버병을 진단받고, 하기를 갖는 것으로 식별된다: 1) 피하 결절; 및/또는 2) 대조군 값의 30% 미만인 백혈구 세포, 배양된 피부 섬유아세포 또는 다른 생물학적 공급원(예를 들어, 혈질)에서의 산 세라미다제 활성 값; 및/또는 3) 생물정보학, 유전자 발현 연구 및/또는 다른 방법을 통해 산 세라미다제 단백질의 기능의 가능한 소실을 나타내는 산 세라미다제 유전자(ASAH1)의 2 가지 대립유전자 내에서의 뉴클레오타이드 변화. 일부 구현예에서, 대상체는 28주 동안 2주마다 rhAC를 투여받는다. 일부 구현예에서, rhAC의 전달은 정맥내 주입(예를 들어, 식염수 주입)에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 약 2 mg/kg에서 시작하고 약 5 mg/kg rhAC(예를 들어, 4주째에 5 mg/kg)까지 상승한다.

[0160] 부가적인 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 파버병과 연관된 염증을 치료하는 방법이 개시되며, 상기 방법은 약 1 mg 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg의 유효량의 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 적어도 10 또는 적어도 20주 동안, 28주 동안 또는 대상체의 생애 동안 예를 들어, 1주에 1회, 2주마다 1회, 또는 1개월에 1회 반복 투약량을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여는 정맥내 주입에 의한 것이다. 일 구현예에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 파버병을 치료하는 방법은 약 1 mg 내지 약 5 mg/kg, 또는 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg의 유효량의 재조합 인간 산 세라미다제(rhAC)를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 적어도 10 또는 적어도 20주 동안, 28주 동안 또는 대상체의 생애 동안 예를 들어, 1주에 1회, 2주마다 1회, 또는 1개월에 1회 반복 투약량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0161] 투약량은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회, 1일 4회, 1주 1회, 1주 2회, 2주마다 1회, 또는 1개월에 1회 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 용량은 1주에 1회 투여된다. 치료는 또한, 단일 용량 스케쥴 또는 다중 용량 스케쥴로 주어질 수 있으며, 이러한 스케쥴에서 치료의 1차 경과는 1~10 가지의 개별 용량, 뒤이어 반응을 유지시키고/시키거나 강화시키는 데 필요한 후속적인 시간 간격에서 주어진 다른 용량으로, 예를 들어, 제2 용량, 및 필요하다면 수개월 후에 후속 용량(들)에 대해 1~4개월 동안 1주에 1회로 수행될 수 있다. 적합한 치료 스케쥴의 예는: (i) 0, 1개월 및 6개월, (ii) 0, 7일 및 1개월, (iii) 0 및 1개월, (iv) 0 및 6개월, 또는 질병 증상을 감소시키거나 질병의 중증도를 감소시키는 것으로 기대되는 요망되는 반응을 유도하기에 충분한 다른 스케쥴이다. 다른 치료 스케쥴, 예컨대 비제한적으로 상기 기재된 것들이 또한 사용될 수 있다.

[0162] 본 개시내용의 소정의 양태에서, 치료는 대상체가 신생아, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10세 미만, 또는 1세 내지 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 60, 70 또는 80세(예를 들어, 1 내지 2세, 1 내지 3세 등)인 경우 시작된다. 일부 구현예에서, 대상체는 16 내지 61세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 16세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 12 내지 69세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 12세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 19 내지 74세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 19세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 4 내지 62세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 4세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 7 내지 42세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 7세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 1 내지 6개월이다. 일부 구현예에서, 대상체는 신생아때에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 6개월째에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 6 내지 43세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 6세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 5 내지 31세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 5세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 5 내지 57세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 5 내지 29세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 1 내지 3세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 1세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 10 내지 70세이다. 일부 구현예에서, 대상체는 10세에 치료를 시작한다. 일부 구현예에서, 대상체는 5 내지 80세, 10 내지 70세, 20 내지 75세, 5 내지 60세, 또는 5 내지 30세이다.

[0163] 일부 구현예에서, 파버병을 진단받은 대상체는 약 1 mg/kg 내지 약 5 mg/kg rhAC 또는 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg rhAC의 rhAC를 2주마다 투여받는다. 일 구현예에서, 투약량은 4주째에 1 mg/kg 또는 2 mg/kg으로부터 5 mg/kg까지 상승한다. 용량 수준이 개별 대상체에 의해 관용되지 않는다면, 해당 대상체에 대한 용량은 적절하다면, 2 mg/kg으로부터 1 mg/kg까지, 또는 5 mg/kg으로부터 2 mg/kg까지 감소될 수 있다. rhAC는 적어도 10, 20 또는 30주 동안 또는 대상체의 생애 동안 2주마다 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 대상체는 파버병을 진단받고, 하기를 갖는 것으로 식별된다: 1) 피하 결절; 및/또는 2) 대조군 값의 30% 미만인 백혈구 세포, 배양된 피부 섬유아세포 또는 다른 생물학적 공급원(예를 들어, 혈질)에서의 산 세라미다제 활성 값; 및/또는 3) 생

물정보학, 유전자 발현 연구 및/또는 다른 방법을 통해 산 세라미다제 단백질의 기능의 가능한 소실을 나타내는 산 세라미다제 유전자(ASAH1)의 2 가지 대립유전자 내에서의 뉴클레오타이드 변화. 일부 구현예에서, 대상체는 28주 동안 2주마다 rhAC를 투여받는다. 일부 구현예에서, rhAC의 전달은 정맥내 주입(예를 들어, 식염수 주입)에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 약 2 mg/kg에서 시작하고 약 5 mg/kg rhAC(예를 들어, 4주째에 5 mg/kg)까지 상승한다.

[0164] 예를 들어, 부위 특이적 투여는 신체 구획 또는 강(cavity), 예컨대 관절내, 기관지내, 복강내, 피막내(intracapsular), 연골내(intracartilaginous), 강내(intracavitary), 복내(intracelial), 소뇌내, 뇌실내(intracerebroventricular), 결장내(intracolic), 자궁경관내(intracervical), 위내(intragastric), 간내(intrahepatic), 심근내(intramyocardial), 골내(intraosteal), 골반내(intrapelvic), 심막내(intrapericardiac), 복강내, 흉막강내(intrapleural), 전립선내(intraprostatic), 폐내(intrapulmonary), 직장내(intrarectal), 신장내(intrarenal), 망막내(intraretinal), 척수내(intraspinal), 활액막내(intrasynovial), 흉곽내(intrathoracic), 자궁내(intrauterine), 방광내(intravesical), 병변내(intralesional), 질(vaginal), 직장, 협측, 설하, 비내 또는 경피 수단으로 갈 수 있다.

[0165] 본원에 기재된 치료 조성물은 특히 액체 용액 또는 현탁액의 형태에서 비경구(피하, 근육내 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여에 사용되기 위해 제조될 수 있다. 제제는 또한, 주사 가능한 제제에 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 주사 가능한 제제는 멸균된다. 일부 구현예에서, 주사 가능한 제제는 발열원이 없다. 일부 구현예에서, 제제는 본원에 기재된 항원 이외의 다른 항원에 결합하는 다른 항체가 없다.

[0166] 치료 조성물은 또한, 약제학적으로 허용 가능한 보조제, 부형제 및/또는 안정화제를 포함할 수 있고, 고체 또는 액체 형태, 예컨대 정제, 캡슐, 분말, 용액, 현탁액 또는 에멀젼으로 존재할 수 있다. 이러한 부가적인 약제학적으로 허용 가능한 성분은 여러 가지 효소 대체 치료법 조성물에서 사용되어 왔고, 비제한적으로 트리소듐 시트레이트, 시트르산, 인간 혈청 알부민, 만니톨, 소듐 포스페이트 모노베이직(monobasic), 소듐 포스페이트 디베이직(dibasic), 폴리소르베이트, 소듐 클로라이드, 히스티딘, 수크로스, 트레할로스, 글리신 및/또는 주사용수를 포함한다. 일부 구현예에서, 염은 하이드레이트(예를 들어, 트리소듐 시트레이트 디하이드레이트, 시트르산 모노하이드레이트, 소듐 포스페이트 모노베이직 모노하이드레이트, 및/또는 소듐 포스페이트 디베이직 헵타하이드레이트)이다.

[0167] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 바와 같이 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조성물은 대상체에게 경구로, 흡입에 의해, 비내 설치에 의해, 국소적으로, 경피로, 비경구로, 피하로, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 근육내 주사, 흉막강내로, 복강내로, 경막내로, 또는 점막에의 적용에 의해 투여된다.

[0168] 본원에 기재된 치료 조성물은 특히 액체 용액 또는 현탁액의 형태에서 비경구(피하, 근육내 또는 정맥내) 또는 임의의 다른 투여에 사용되기 위해 제조될 수 있다. 제제는 또한, 주사 가능한 제제에 적합할 수 있다. 일부 구현예에서, 주사 가능한 제제는 멸균된다. 일부 구현예에서, 주사 가능한 제제는 발열원이 없다. 일부 구현예에서, 제제는 본원에 기재된 항원 이외의 다른 항원에 결합하는 다른 항체가 없다.

[0169] 파버병 또는 rhAC 활성과 연관된 다른 질환을 치료할 수 있는 rhAC의 단백질 또는 rhAC 관련 병태를 치료하기 위한 용도는 관련 증상 또는 병태에서 감소, 분해 또는 개선에 영향을 주기에 충분한 양으로 대상체에게 제공되고자 한다. 이러한 병태는 대상체에서 본원에 기재된 바와 같은 파버병의 증상을 포함한다. 양은, 작용제의 투약량, 투여 경로 및 투약 스케쥴이 이러한 반응에 영향을 주기에 충분하다면, 증상의 감소에 "영향을 주기"에 충분하거나 "치료적 유효량"이라고 한다. 단백질에 대한 반응은 조직 시료의 이미징 기법에 의해 또는 생체외 분석에 의해서와 같이 대상체의 영향받는 조직, 기관 또는 세포의 분석에 의해 측정될 수 있다. 작용제는 이의 존재가 수혜자 환자의 생리학에서 검출 가능한 변화를 초래한다면 생리학적으로 유의하다. 일부 구현예에서, 양은, 이러한 양이 대상체가 받는 파버병의 증상을 치료하거나, 개선하거나, 저해하는 데 사용될 수 있는 양인 경우, 치료적 유효량이다. 이러한 양의 비제한적인 예는 본원에 제공되지만, 문맥이 다른 양을 지시한다면 이러한 양으로 제한되지 않고자 한다.

[0170] 단백질은 약제학적으로 유용한 조성물을 제조하기 위해 기지의 방법에 따라 제제화될 수 있으며, 이에 의해 이들 물질 또는 이들의 작용성 유도체는 약제학적으로 허용 가능한 담체 비히클과 혼합되어 조합된다.

[0171] 파버병 또는 rhAC 활성과 연관된 다른 질환을 치료할 수 있는 rhAC의 단백질 또는 rhAC 관련 병태를 치료하기 위한 용도는 관련 증상 또는 병태에서 감소, 분해 또는 개선에 영향을 주기에 충분한 양으로 대상체에게 제공되고자 한다. 이러한 병태는 대상체에서 본원에 기재된 바와 같은 파버병의 증상을 포함한다. 양은, 작용제의 투

약량, 투여 경로 및 투약 스케쥴이 이러한 반응에 영향을 주기에 충분하다면, 증상의 감소에 "영향을 주기"에 충분하거나 "치료적 유효량"이라고 한다. 단백질에 대한 반응은 조직 시료의 이미징 기법에 의해 또는 생체외 분석에 의해서와 같이 대상체의 영향받는 조직, 기관 또는 세포의 분석에 의해 측정될 수 있다. 작용제는 이의 존재가 수혜자 환자의 생리학에서 검출 가능한 변화를 초래한다면 생리학적으로 유의하다. 일부 구현예에서, 양은, 이러한 양이 대상체가 받는 파버병의 증상을 치료하거나, 개선하거나, 저해하는 데 사용될 수 있는 양인 경우, 치료적 유효량이다. 이러한 양의 비제한적인 예는 본원에 제공되지만, 문맥이 다른 양을 지시한다면 이러한 양으로 제한되지 않고자 한다.

[0172] 일부 구현예에서, 치료의 효능은 임의의 하기 수단에 의해 평가될 수 있다:

[0173] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 순 결절(≥5 mm) 카운트에서 기준선으로부터의 변화 퍼센트;

[0174] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 순 결절(≥10 mm) 카운트에서 기준선으로부터의 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0175] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 총 결절 카운트(크기 상관없음)에서 기준선으로부터의 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0176] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 선택된 관절에서 관절 운동 범위의 기준선으로부터의 변화와 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0177] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 6-분 보행 거리의 기준선으로부터의 변화와 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0178] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 폐 기능 검사의 기준선으로부터의 변화와 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0179] · 28주 동안 rhAC를 이용한 치료 후 FDT 점수의 기준선으로부터의 변화와 변화 퍼센트 및 위약과의 비교;

[0180] · 28주에 걸쳐 rhAC 또는 위약을 이용한 치료 동안 연령에 대한 체중 및 키의 Z-점수에서 기준선으로부터의 변화 및 변화 퍼센트.

[0181] 일부 구현예에서, 상이한 용량에서 파버 마우스 또는 건강한 마우스에게 투여 후 RVT-801의 약물동력학은 비구획(nonsectional) 방법에 기초하여 평가된다. 비구획 약물동력학 방법은 당업계에 알려진 하기 메트릭스(metrics)와 함께 다른 것들 중에서도 농도-시간 그래프의 곡선 아래 면적을 추정함으로써 약물에의 노출을 추정한다:

표 5

표 5

[0182]

특징	설명
용량(D)	투여되는 약물의 양
곡선 아래 면적(AUC)	농도-시간 곡선의 적분: $AUC_{0-\tau} = \int_{t}^{t+\tau} C\,dt$
소실 반감기($t_{1/2}$)	약물의 농도가 이의 원래의 값의 1/2 에 도달하기 위해 필요한 시간: $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_e}$
$C_{최대}$	최대 관찰 농도
$T_{최대}$	최대 관찰 농도의 시간
$T_{마지막}$	최종 정량 가능한 농도의 시간
$AUC_{마지막}$	0 으로부터 마지막 정량 가능한 시점까지의 농도-시간 곡선 아래 면적
Vz/F	혈관외 투여 후 분포의 겉보기(apparent) 부피
CL/F	혈관외 투여 후 겉보기 청소율(clearance)

[0183] 일부 구현예에서, 치료의 조직-특이적 효능은 상기 기재된 비구획 약물동력학 방법에 기초하여 RVT-801의 조직-특이적 약물동력학을 결정함으로써 평가된다.

[0184] 일부 구현예에서, 파버병 마우스에 대한 유효 용량에 상응하는 RVT-801의 인체 등가 용량(HED; Human Equivalent Dose)이 추정된다. 본원에서 HED의 비임상적 평가는 2 가지 방법에 기초하여 왔다: 1) 비임상적 종과 인간 사이에서 체표면적(BSA)에 의한 스케일링(scaling)에 대한 FDA 지침, 및 2) 세라마이드 축적에 대한 주 조직으로서 그리고 RVT-801의 흡수가 지배적인 간 및 비장에 대한 종 사이에서의 기관:체중 비.

[0185] 체표면적에 의한 스케일링: 파버 마우스 MED(최대 유효 용량)에 대해 벤치마킹하고 인간 성인 또는 아동에 대한 BSA 및 체중에 기초한 HED(여기서, HED = 동물 용량 * (동물 체중/인간 체중)0.33은 60 kg 성인에 대해 약 0.81 mg/kg 및 15 kg 아동에 대해 약 1.2 mg/kg의 용량을 나타냄).

[0186] 기관에 의한 스케일링: 체중 비: PK 연구는, 혈관구조(vasculature)로부터의 청소 기전이 조직 내로의 흡수 및/또는 분포와 연관이 있으므로, 조직 중량-대-체중 비는 용량에 영향을 줄 수 있고 BSA 모델은 그 자체에 대해 충분히 예측적일 수 없음을 실증하였다. $HED = MED * (조직_{인간}/BW_{인간})/(조직_{마우스}/BW_{마우스})$를 사용하여, 마우스에서 10 mg/kg 용량은 인간 성인 및 아동에서 간 및 비장을 기준으로 성인 인간에서 약 3~5 mg/kg 용량 또는 15 kg 아동에서 약 4~5 mg/kg 용량과 동등하다.

[0187] 일부 구현예에서, HED는 상기 2 가지 스케일링 접근법을 조합함으로써 결정될 수 있다.

[0188] 본원 및 하기에서 기재된, 본원에 기재된 구현예를 수행하는 데 유용한 키트가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 상기 기재된 폴리펩타이드를 함유하거나 이와 연관되어 포장되는 제1 용기를 포함한다. 상기 키트는 또한, 구현예를 수행하는 데 필요하거나 편리한 연관 용액을 함유하거나 포장되는 다른 용기를 포함할 수 있다. 용기는 유리, 플라스틱 또는 호일로 제조될 수 있고, 바이얼, 병, 파우치, 튜브, 백 등일 수 있다. 상기 키트는 또한, 작성된 정보, 예컨대 구현예를 수행하기 위한 절차 또는 분석 정보, 예컨대 제1

용기 수단에 함유된 시약의 양을 함유할 수 있다. 용기는 작성된 정보와 더불어 다른 용기 장치, 예를 들어, 박스 또는 백에 존재할 수 있다.

[0189] 본원에 대해 제공된 더욱 다른 양태는 파버병을 치료하기 위한 키트이다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 rhAC 폴리펩타이드 또는 상기 rhAC 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 적어도 하나의 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 rhAC를 발현하도록 구성된 세포를 포함하는 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CHO 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 키트는 rhAC를 발현하는 세포로부터의 조건화된 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 조건화된 배지는 CHO 세포로부터의 것이다.

[0190] 이제 주제는 하기 실시예를 참조로 하여 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적을 위해 제공되고, 청구항은 이들 실시예에 제한되는 것으로 간주되어서는 안 되며, 그보다는 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 변동 및 모든 변동을 포괄하는 것으로 간주되어야 한다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 산출하기 위해 변화되거나 변형될 수 있을 여러 가지 중요하지 않은(non-critical) 매개변수를 쉽게 인식할 것이다.

[0191] **실시예**

[0192] **실시예 1**

[0193] **재료 및 방법**

[0194] 동물 선별 및 시료 수집

[0195] 파버 마우스(Asah1P361R/P361R) 및 대략적으로 연령-매칭된 야생형 CD-1 마우스(Asah1P361R/P361R의 부모 균주)를 He 등, 2017에 따라 유지시켰으며, 이 문헌은 그 전문이 참조에 의해 포함된다.

[0196] 전혈, 간, 폐 및 비장을, 유세포분석에 의한 특징화를 위해 4 내지 8 주령 연령-매칭된 파버 및 야생형 마우스(n=3)로부터 수집하였다.

[0197] 혈액 시료를 심장 천자 또는 다른 승인된 수단에 의해 그룹 당 모든 동물로부터 수집하여, 각각의 마우스로부터 최대 부피의 혈액 시료를 생성하였다. 혈액 시료를 개별 리튬 헤파린 바이얼에 수집하고, 몇번 부드럽게 뒤집어서 항응고제를 분산시켰다. 혈액 시료를 2 개의 동일한 분취물로 분리하였다. 하나의 분취물을 후속 지질 프로파일링을 위해 냉동시켰다. 제2 분취물을 적절하게 표지된 폴리스티렌 튜브에 넣고, 유세포분석을 위한 가공 시까지 얼음 상에 놓았다.

[0198] 말기(terminal) 혈액 시료의 수집 직후 부검 시 조직을 수집하였다. 완전하며 온전한 간, 비장 및 폐를 그룹 당 세(3) 마리 이하의 동물로부터 수집하였다. 각각의 조직을 제거하고, 부드럽게 건조 블로팅(blot)하였다. 각각의 조직을 개별적인 예비-표지된 바이얼에 넣었으며, 상기 바이얼을 조직 수집 전에 (캡(cap)과 함께) 질량측정하였다. 조직을 포함하는 캡핑된 바이얼의 질량을 측정하였다. 완충제, 보존제 또는 항생제 중 어느 것도 조직에 첨가하지 않았다. 조직 질량(즉, 시료 + 바이얼 질량 - 바이얼 질량)을 기록하였다. 조직을 냉동시키기 전에, 유세포분석을 통한 분석에 지정된 간, 비장 및 폐(대략 0.025 g)의 일부를 제거하고, 3~5 mL 포스페이트 완충 식염수(PBS, pH 7.4; Gibco)를 함유하는 적절한 크기의 폴리스티렌 페트리 디쉬에 넣었다. 시료를 함유하는 페트리 디쉬를, 탐구 종점(exploratory endpoint)을 위해 단일-세포 현탁액으로 가공 시까지 얼음 상에 보관하였다. 유세포분석에 사용된 질량을 기록하였다. 각각의 조각의 질량 결정 직후, 지질 분석용으로 의도된 모든 조직 시료를 생물분석 실험실(bioanalytical lab)로 선적하기에 앞서 -70℃에서 보관하기 위해 냉동시켰다.

[0199] 단일 세포 현탁액으로의 조직 가공

[0200] (a) 혈액

[0201] 동일한 부피의 PBS를 각각의 혈액 시료에 첨가하고, 2 mL의 1X FACS 용해(lysing)액(BD Bioscience)을 추가로 첨가하였다. 시료를 부드럽게 보텍싱(vortex)하고, 실온의 암실에서 10분 동안 인큐베이션하고, 원심분리에 의해 3회 세척하였다. 세포를 검정법 완충제(PBS 중 5% 정상 래트 혈청(NRS; Normal Rat Serum))에서 20 x 106 세포/mL로 재현탁시켰다. 시료를 염색 시까지 얼음 상에서 보관하였다.

[0202] (b) 비장 및 간

[0203] 2개의 현미경 슬라이드의 반투명(frosted) 부분을 사용하여, 비장 또는 간 조직을 균질화하였다. 슬라이드에 페트리 디쉬에 제공된 PBS를 넣어, 모든 세포가 PBS에서 수집되게 하였다. 균질화 후, 모든 PBS(현재 단일 세포, 뿐만 아니라 조직의 작은 조각을 함유함)를 수합하고, 필터를 통합된 거르개(integrated strainer)가 있는

Falcon 튜브를 통해 균질화하였다. 300 x g에서 5분 동안 원심분리 및 상층액 제거 후, 세포를 100 μL PBS에 재현탁시키고, 뒤이어 2 mL의 1X FACS 용해액을 첨가하였다. 다음, 세포 현탁액을 부드럽게 보텍스하고, 실온의 암실에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 원심분리에 의해 3회 세척한 후, 세포를 검정법 완충제(PBS 중 5% NRS)에서 20 x 106 세포/mL로 재현탁시켰다. 시료를 염색 시까지 얼음 상에서 보관하였다.

[0204] (c) 폐

[0205] RPMI 1640 배지(GlutaMAX™ Supplement, Thermo Fischer Scientific), 1 mg/mL 콜라게나제 II(Fisher Scientific) 및 5 U/mL DNAseI(Sigma)를 이용하여 소화(digestion) 배지를 제조하였다. 폐를 작은 조각으로 절단하고, 페트리 디쉬에서 폐 당 5 ml 소화 배지에 현탁시키고, 37℃에서 대략 1.5시간 동안(그러나 2시간을 초과하지 않음) 쉐이킹(shaking)하면서 인큐베이션하였다. 2개의 현미경 슬라이드의 반투명 부분을 사용하여, 폐 조직을 균질화하였다. 슬라이드에 페트리 디쉬에 제공된 소화 배지를 넣어, 모든 세포가 수집되게 하였다. 균질화 후, 모든 소화 배지(현재 단일 세포, 뿐만 아니라 조직의 작은 조각을 함유함)를 수합하고, 필터를 통합된 거르개가 있는 Falcon 튜브를 통해 균질화하였다. 300 x g에서 5분 동안 원심분리 및 상층액 제거 후, 세포를 100 μL PBS에 재현탁시키고, 뒤이어 2 mL의 1X FACS 용해액을 첨가하였다. 다음, 세포 현탁액을 부드럽게 보텍스하고, 실온의 암실에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 원심분리에 의해 3회 세척한 후, 세포를 검정법 완충제(PBS 중 5% NRS)에서 20 x 106 세포/mL로 재현탁시켰다. 시료를 염색 시까지 얼음 상에서 보관하였다.

[0206] 유세포분석 시료 염색

[0207] 염색 절차를 하기와 같이 수행하였다: 제조업체의 설명서에 따른 1차 염색 후, 1:200 생존한/사멸한 좀비 레드를 세포에 첨가하였다. 표면 마커의 염색 및 생존한/사멸한 집단의 식별 후, 세포를 300 uL의 BD FACS/용해 고정제에 재현탁시켜, 임의의 적혈구 세포를 용해시켰다. 항체 최적화 연구로부터 대조군을 사용하였다. 시료를 염색시키기 위한 항체 세트를 하기와 같이 제조하였다.

표 6

표 6

[0208]

단핵구-유래 세포성 하위집단을 평가하기 위한 유세포분석 패널				
마커	클론	형광단	회사	카탈로그 #
CCR2	SA203G11	BV421	BioLegend	150605
CD68	FA-11	Alexa647		137004
CD11c	N418	BV711		117349
MHCII	M5/114.15.2	BV510		107635
CD86	GL-1	BV605		105037
CD206	C068C2	Alexa488		141710
CD11b	M1/70	BV650		101259
CD45	104	PE-Cy7		109830
Ly6G	1A8	APC-Cy7		127624
Ly6C	HK1.4	PE-CF594		128044
CX3CR1	SA011F11	PE		149006
F4/80	BM8	PE-Cy5		123112
CD23	B3B4	Alexa700		101632
생존/사멸 마커	NA	Fixable Red	Thermo Fisher	L34972

표 7

표 7

림프구 세포성 하위집단을 평가하기 위한 유세포분석 패널				
마커	클론	형광단	회사	카탈로그 #
CD3	500A2	Alexa700	BioLegend	152316
CD19	6D5	Alexa488		115521
CD4	GK1.5	APC-Cy7		100414
CD8	43-6.7	BV650		100742
CD62L	MEL-14	BV605		104438
CD44	IM7	PE		103008
CD45	104	PE-Cy7		109830
CCR7	4B12	PE-Cy5		120114
CD127	A7R34	BV711		135035
MHCII	M5/114.15.2	BV510		107635
CD38	90	Alexa647		102716
CCR6	BV421	29-2L17		129818
CXCR3	CXCR3-173	PE-CF594		126534
생존/사멸 마커	NA	Fixable Red	Thermo Fisher	L34972

[0209]

[0210] 사용된 항체의 부피를 적정 실험 동안 결정하였다. 100 μL의 세포 시료를 96-웰 V-바닥 플레이트에 첨가하였다. 단일 염색 대조군(100 μL/웰) 세트를 보상(compensation)을 위해 제조하고, 형광 마이너스 원(FMO) 대조군 세트를 모든 동물로부터의 풀링된 시료를 사용하여 각각의 조직에 대해 제조하였다. 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 스핀 다운시켰다. 완충제를 제거하고, 시료를 100 μL의 1 μg/mL TruStain FcX Block(BioLegend, 101320))로 얼음 상에서 대략 10분 동안 재현탁시켰다. 이러한 인큐베이션 후, 100 μL의 적절한 항체를 각각의 시료에 첨가하고, 시료 플레이트를 덮고 얼음 상에서 대략 30분 동안 인큐베이션하였다. 다음, 시료 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 스핀 다운시켜, 상층액을 제거하였다. 세포를 200 μL의 검정법 완충제(PBS 중 5% NRS)에 재현탁시켰다. 시료 플레이트를 500 x g에서 5분 동안 스핀 다운시켜 상층액을 제거하고, 세포를 200 μL의 고정 완충제(BD Bioscience, 339860)에 재현탁시켰다. 시료를 4℃에서 덮어 보관하였다.

[0211] *유세포분석 시료 획득 및 분석*

[0212] 시료를 BD Bioscience LSRII 장비 상에서 Diva 소프트웨어를 사용하여 획득하였다. 단일 염색된 시료를 전압의 적절한 조정에 사용하여, 최적의 신호 대 노이즈, 보상 매트릭스의 적용, 및 모든 형광단 채널의 적절한 표지를 보장하였다. 1 백만개의 사건(event) 또는 최대 부피의 시료를 각각의 시료에 대해 기록하였다. 수득된 유세포분석 데이터를 FlowJo v10 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0213] **결과**

[0214] 유세포분석 데이터를 분석하여, 4 내지 8 주령 파버 마우스(Asah1$^{P361R/P361R}$) 및 연령-매칭된 야생형 마우스로부터 수집된 혈액, 및 간, 비장 및 폐 조직에서 세포성 조성물 및 활성화 상태를 비교하였다.

[0215] *조직에 걸쳐 생존력의 평가*

[0216] 도 1 내지 도 5b에 도시된 바와 같은 유세포분석 검정법은 야생형 마우스에서의 벌크 세포 분포 및 세포 건강의 일반적인 상태에 대한 정보를 나타낸다. 단핵구는 SSC^{mid}FSC^{mid}로서 식별됨을 주지한다. 이 분포로부터의 임의의 변경은 질병 상태를 나타낼 수 있다.

[0217] 비장은 파버 마우스와 야생형 마우스 사이에서 세포 생존력의 주지할 만한 차이를 나타내었다. 야생형 대조군과 비교하여 파버 마우스에서 감소된 비장 생존력은 세라마이드의 직접적인 효과에 관한 것이거나 염증 과정을 통

한 것일 수 있다(도 2a 및 도 2b). 파버 마우스에서의 폐 생존력은 야생형 대조군과 유사하였으며(도 3a 및 도 3b), 이는 세포 사멸의 단일 단계만 구분하는 능력을 반영할 수 있다. 야생형 대조군과 비교하여 파버 마우스에서 유사한 간 및 혈액 생존력이 관찰되었다(도 4a, 도 4b, 도 5a 및 도 5b).

[0218] **CD45+**

[0219] 백혈구($CD45^+$) 세포의 증가된 빈도 또는 세포 분포의 변화는 대부분 만성 염증 또는 감염에 의해 매개된다. 파버 마우스 및 야생형 마우스에서 CD45+세포의 % 및 CD45+구획의 구성에 주지할 만한 변화가 이루어졌다. 도 6a, 도 6b, 도 7a 및 도 7b는 4 및 8 주령 파버 마우스 및 연령-매칭된 야생형 마우스 사이에서 비장 및 혈액 내 백혈구($CD45^+$ 세포) 및 단핵구(SSC^{mid}/FSC^{mid})의 집단을 비교한다. 백혈구($CD45^+$ 세포)의 빈도는 비장에서 비교적 유사한 수준에 머물러 있었다. 도 7a 및 도 7b에서 도시된 바와 같이(화살표로 표시됨), 단핵구의 빈도는 야생형 마우스와 비교하여 파버 마우스에서 증가하였다. 더욱이, 단핵구의 빈도는 야생형과 비교하여 파버 마우스의 비장에서 5-배 초과 증가하였다. 이는 비장 조직에서의 변화를 반영하는 말초(peripheral) 빈도와 상관관계가 있다.

[0220] **$MHCII^-CD11b^{hi}$(활성화된 단핵구)**

[0221] 단핵구/과립구를 효과기 하위-집단으로 더 세분한다. (Misharinet al, Am J Respir Cell Mol Biol. 2013 Oct; 49(4):503-10.). 하위세트 중에서, $MHCII^-CD11b^{hi}$ 집단은 활성화된 단핵구를 나타낸다. 도 9a에 도시된 바와 같이, $MHCII^-CD11b^{mid}$에서의 병행된 저하와 함께 $MHCII^-CD11b^{hi}$ 집단에서의 확연한 증가는 야생형과 비교하여 파버 마우스 폐에서 관찰되었다. 유사하게는, 도 9b에 도시된 바와 같이, $MHCII^-CD11b^{hi}$ 집단에서의 확연한 증가는 야생형과 비교하여 파버 마우스 비장에서 관찰되었다(도 9b 및 도 10a). 조직에서 이러한 증가된 빈도는 또한, 혈액에서 반영된다(도 10b). 파버 마우스의 조직 및 말초에서의 활성화된 단핵구($MHCII^-CD11b^{hi}$)의 증가된 빈도(도 11)의 이들 발견은 파버병에 대한 면역-표현형 마커로서 $MHCII^-CD11b^{hi}$를 지지한다.

[0222] $MHCII^+CD11b^-Ly6C^+$(전-염증성 단핵구 계통)

[0223] $MHCII^+CD11b^-$는 $Ly6C^{+/-}$로 더 세분될 수 있다. $Ly6C^+$ 단핵구는 전-염증성으로 분화하는 경향이 더 있다. $Ly6C^-$ 단핵구는 M2 대식세포로 분화하는 경향이 더 있으며 항-염증성이다. 도 13a에 도시된 바와 같이, $MHCII^+CD11b^-$ 집단의 전-염증성 $Ly6C^+$ 하위세트는 야생형 마우스와 비교하여 파버 마우스의 폐에서 증가하였다. 파버 마우스의 비장 및 혈액에서 Ly6C+ 전-염증성 세포의 빈도는 유사하였다. (도 12b 및 도 13b). 이들 발견은 인 시추(in situ)에서 염증성 환경이 전-염증성 세포의 발생을 더 촉진할 수 있음을 나타낸다. 파버 마우스에서, 전-염증성 대식세포 및 수지상 세포의 이러한 증가는 또한, 혈액에서 검출되었으며, 파버병에 대한 말초 마커로서 $MHCII^-CD11b^{hi}Ly6C^+$를 지지한다.

[0224] **$MHCII^-CD11b^{hi}CD86^+$(활성화된 전-염증성 대식세포 및 수지상 세포)**

[0225] 도 14a 및 도 14b는, CD11b+MHC-DC 집단 내에서 CD23, CD68 및 CD86 활성화 마커가 야생형 마우스와 비교하여 파버 마우스 폐에서 증가하였음을 도시한다. 특히, 파버 마우스에서 MHC-CD11b+ 집단 내에서의 CD86의 증가된 발현(도 14b, 우측 패널)은 면역 세포 동원 및 활성화를 유도하여 염증 반응을 영속(perpetuate)시키기 위해 세포를 프라임(prime)하는 능력을 나타낸다. 이러한 결과는 파버병에 대한 면역-표현형 마커로서 MHCII-CD11bhi CD86+를 지지한다.

[0226] **$CD11b^+CD38^+$ 및 $CD11b^+CD206^+$(대식세포의 극성화(polarization))**

[0227] 파버 마우스는 전-염증성 대식세포의 증가 및 항-염증성 대식세포의 저하를 갖는다(도 15a 및 도 15b). 대식세포의 극성화는 사이토카인 환경 및 영양소 공급원에 의해 조절된다. 사이토카인/케모카인은 표적 세포에서 화학주성을 구동하고 세포 변화를 유도할 수 있는 세포 신호전달 분자이다.

[0228] $CD11b^+Ly6G^+$**(호중구)**

[0229] 도 16 내지 도 19 및 도 20a 내지 도 20d에 도시된 바와 같이, 파버 마우스의 모든 폐, 비장 및 간은 4 주령까

지 호중구($CD11b^{+}Ly6G^{+}$)의 증가된 빈도를 나타내었다(야생형과 비교하여 2~7배 증가). 호중구의 증가는 파버 마우스와 야생형 마우스 사이에서 조직에 걸쳐 가장 두드러진 분화 인지였다(하기 표 8 참조). 호중구 침윤에서 조기의 강력한 증가는 단핵구 동원을 포함한 후속적인 면역 반응을 구동하는 것을 도와서, 전-염증성 사이토카인의 생성을 통해 파버 마우스에서의 병태에 기여할 수 있다.

[0230] 나아가, 도 20d에 도시된 바와 같이, 조직-체류 호중구 빈도의 증가 또한, 파버 마우스의 혈액에서 반영되었으며, 이는 $CD11b^{+}Ly6G^{+}$를 파버병에 대한 강한 표현형 마커로서 지지한다.

[0231] **$CD19b^{-}CD3^{+}$(T 세포)**

[0232] 도 21 내지 도 24에 도시된 바와 같이, 파버 마우스의 모든 폐, 비장 및 간은 4주와 8주 둘 모두에서 T 세포(CD19b-CD3+)의 저하된 빈도를 나타내었다(도 24). 이러한 발견은 파버 마우스에서 흉선 구조의 실질적인 파괴 및 흉선 T 세포의 저하에 대한 이전의 관찰(Dworski et al., 2015), 및 림프구 발달 및 장(intestine)으로의 이동의 조절에서 스핑고신 1-포스페이트 의존성과 일치한다. (Kunisawa et al., 2007.)

[0233] **$CD19b^{+}CD38^{+}$(활성화된 B 세포)**

[0234] 도 25 및 도 27a에 도시된 바와 같이, 파버 마우스는 CD19+에 의해 입증된 바와 같이 비장에서 B 세포의 증가된 빈도를 갖는다. 비장에서 B 세포 구획 내에서, 파버 마우스는 CD38+에 의해 입증된 바와 같이 활성화된 B 세포(형질아세포)의 증가된 빈도를 가졌다(도 26및 도 27b). 활성화된 B 세포의 증가된 빈도는 도 28, 도 29a 및 도 29b에 도시된 바와 같이 말초에서 반영되었다. T 세포의 저하는 흉선 파괴와 관련이 있을 가능성이 있는 반면, 활성화된 B 세포의 증가는 항원 제시 세포의 풍부(abundance)로 인한 가능성이 있다. T 세포 동역학과 B 세포 동역학 둘 모두는, 반응이 단핵구(및 유래된 하위집단)와 호중구 침윤 및 활성화에 2차적임을 시사한다.

[0235] **$CD45^{hi}SS^{hi}$(호산구 또는 호염기구)**

[0236] 파버 마우스 폐에서, 면역 세포의 전반적인 빈도는 어떠한 연령에서도 야생형 마우스와 비교하여 저하되었다(도 30a). 특히, CD45hiSShi 세포(도 30a, 검정색 외형선)는 파버 마우스에서 완전히 사라졌다.

[0237] 파버 마우스 간에서, 면역 세포의 빈도는 파버 마우스와 야생형 마우스 둘 모두에서 일반적으로 낮았다(도 30b). 간은 복잡한 조직학적 구조를 가지며, 이러한 구조는 주로 간 세포성 구성성분의 70% 간세포(CD45-)로 구성되며, 이때 간내(intrahepatic) 림프구(IHL)는 잔여 비실질(nonparenchymal) 세포(30%)의 16~22%를 이룬다. 8-주령 파버 마우스에서 CD45+SShi 세포는 어떠한 연령에서도 4-주령 파버 마우스 및 WT 마우스와 비교하여 약간 증가되었다.

[0238] **$MHCII^{+}CD11b^{mid}CD23^{+}$**

[0239] CD23은 성숙한 B 세포, 활성화된 대식세포, 호산구, 여포 수지상 세포 및 혈소판 상에서 발현된다. CD23+ 세포의 소실은 파버 마우스 비장 및 폐에서 활성화를 나타낸다. 어떠한 CD23도 혈액 시료에서 발견되지 않았다.

표 8

표 8 8주령 파버 마우스 대 야생형 한배새끼에 대해 평가된 변화.

마커 세트	세포 유형	폐	비장	간	혈액	누적
$CD11b^{+}Ly6G^{+}$	호중구	5	5	2-5	5	+++
$SSC^{mid}FSC^{mid}$(크기)	벌크 단핵구	-	5	5	5	+++
$MHCII^{-}CD11b^{hi}$	활성화된 단핵구	2-5	5	5	1-2	+++
$CD11b^{+}CD206^{+}$	항-염증성 mΦ& DCs	(1-2)	-	-	(5)	(++)
$MHCII^{+}CD11b^{-}Ly6C^{+}$	전-염증성 mΦ & DCs	1-2	-	-	2-5	+
$MHCII^{-}CD11b^{mid}CD23^{+}$	활성화된 전-염증성 mΦ & DCs	-	-	(1-2)	-	(+)
$MHCII^{-}CD11b^{hi}CD86^{+}$	활성화된 전-염증성 mΦ & DCs	1-2	-	-	1-2	+
$CD11b^{+}CD38^{+}$	전-염증성 mΦ & DCs	1-2	2-5	-	5	+++
$CD19^{+}CD38^{+}$	활성화된 B 세포(PBs)	-	2-5	-	2-5	++
$CD19^{-}CD3^{+}$	총 T 세포	(5)	(2-5)	-	(2-5)	**(+++)**

[0240]

[0241] 표 8은 파버병을 진단하기 위해 식별되는 마커의 요약을 제공한다. 연령-매칭된 야생형 마우스로부터의 대조군 시료와 비교하여, "1-2"는 마커 발현에서 1 내지 2배 변화를 나타내며, "2-5"는 2 내지 5배 변화를 나타내며, ">5"는 5배 초과의 변화를 나타내고, "-"는 "시험되지 않거나 결정되지 않음"을 나타낸다. "누적" 점수는 모든 4 가지 조직 및 혈액 시료에서 마커 발현의 합계이고, "+++"는 5배 초과의 변화를 나타내며, "++"는 3 내지 4배의 변화를 나타내고, "+"는 3배 미만의 변화를 나타낸다. 괄호는 야생형 대조군과 비교하여 음성 변화 또는 저하를 나타낸다.

[0242] 단핵구 집단의 특징화는 $MHCII^{-}CD11b^{hi}Ly6C^{+}$ 세포의 빈도에서 확연한 증가를 나타내었다. 이들 세포는 CD86 발현에 의해 입증된 바와 같이 고도로 활성화되었고, CD38 발현에 기초하여 전-염증성 M1 표현형 쪽으로 구부러졌다. $CD206^{+}$ 항-염증성 M2 대식세포에서의 병행되는 저하가 식별되었다. 대식세포 구획 외에도, 비장, 간 및 폐에서 호중구의 강한 증가는 4 주령에 의해 입증되었다(2~7배 대 야생형). 적응 면역 구획에서의 확연한 차이 또한, 주지되었으며, 이때, 전-염증성 단핵구의 증가에 부차적인 것 같은 형질아세포(면역글로불린-생성 형질 세포에 대한 전구체)의 빈도의 분명한 증가가 있었다.

[0243] **면역-핑거프린트**

[0244] 도 33a 내지 도 33d는 파버 마우스 폐, 비장, 간 및 혈액에서 식별된 모든 하위세트에 기초한 면역-핑거프린트의 예를 도시한다.

[0245] 추가의 연구는 rhAC로 치료받은 파버 마우스의 조직의 면역-표현형에 대한 rhAC의 효과를 묘사하기 위해 수행될 것이다. 조직은 전-염증성 마커(예를 들어, CD38, Ly6G) 및 항-염증성 마커(예를 들어, CD206) 및 pan-단핵구 마커(예를 들어, CD11b)를 포함하여 표 2, 표 3 및 표 7에 나열된 파버병을 진단하는 데 사용되는 상기-식별된 마커로 염색될 수 있다.

[0246] 실시예 2. 야생형, 파버 마우스, 및 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)로 치료받은 파버 마우스는 면역 세포 집단 구성(makeup)에 대해 분석되었다. 파버 마우스 모델이 사용되었는데, 이 모델은 산 세라미다제의 비-기능적 버전을 생성한 동형접합성 $Asah1^{P361R/P361R}$ 동물을 제조하기 위해 중증-발병(severe-onset) FD 환자에서 식별된

단일 뉴클레오타이드 미스센스 돌연변이와 함께 W4/129Sv/CD-1 백그라운드 상에서 확립된 "넉-인" 마우스 모델이기 때문이다. 이 질병 모델은 다수의 조직의 단핵구 침윤을 반복하고(recapitulate), 따라서 이 질병 모델을 사용하여 파버병의 면역 환경을 연구하는 데 유용하다.

[0247] 파버 마우스(PCR에 의해 확증되는 유전자형)는 이유(weaning)(3 내지 4 주령) 직후에 시작하는 10 mg/kg/용량의 재조합 인간 산 세라미다제(RVT-801)의 매주 4-1회 복강내(IP) 용량을 투약받았고, 이들의 4번째 그리고 마지막 RVT-801 투여 후(7 주령째) 부검을 위해 안락사시켰다. 대조군 야생형 및 파버 마우스는 비히클을 투약받지 않았고, 각각의 유전자형의 3 마리의 대조군 동물은 부검되었고, 시료는 4 주령 또는 8 주령째에 평가를 위해 수집되었다. 지시된 시점에서, 파버 마우스 및 한배새끼 대조군(WT)은 세라마이드 축적의 주된 조직(비장, 간 및 폐)에서 면역 세포의 조성을 평가하기 위해 수합되었다. 또한, 혈액은 말초에서 조직-특이적 염증과 상관관계를 맺기 위해 수집되었다. 시료는 단일 세포 현탁액으로 가공되었으며, 하기 기재된 표 9(패널 1) 및 표 10(패널 2)에 따라 염색되었고, BD LSRII 유세포분석기 상에서 진행되었다. 단일 염색된 시료(보상 비드) 및 형광 마이너스 원(FMO) 시료는 연구를 위한 대조군으로서 역할을 하였다. 원(raw) 데이터 파일은 FlowJo v10을 사용하여 분석되었고, 대표적인 게이팅 전략은 도 34a 내지 도 34e로서 도시된다.

[0248] 결과. 도 34a 내지 도 34e는 가공으로부터의 세포성 찌꺼기를 제거하기 위해 크기(SSC x FSC)에 기초하여 우선 게이팅된 세포 집단을 도시한다(도 34a). 이 집단은 좀비 레드 염료(도 35b)에 대해 양성인 세포 집단을 제거하기 위해 생존 세포 및 사멸한 세포에 기초하여 추가로 게이팅되었다. 그 후에, 생존 세포는 CD45+ 집단을 선별하기 위해 게이팅되었다(도 34c). 이 집단은, Ly6G 및 CD11b 이중 양성인 $CD45^{+}$ 세포; 또는 호중구의 퍼센트를 결정하기 위해 추가로 게이팅되었다(도 34d). 잔여 집단은 시료 유형 당 활성화된 단핵구의 집단을 결정하기 위해 $CD11b^{+}MHCII^{-}$ 집단에 대해 선별하기 위해 선별되고 게이팅되었다(도 34e). 이는 FlowJo v10을 사용하여 이러한 방식으로 전혈, 비장, 간 및 폐 시료에 대해 수행되었다. 폐 시료는 활성화된 대식세포에 대해 선별하기 위해 추가로 게이팅되었다.

표 9

표 9

호중구 패널		
마커	클론	형광단
CCR2	SA203G11	BV421
CD68	FA-11	Alexa647
CD11c	N418	BV711
MHCII	M5/114.15.2	BV510
CD86	GL-1	BV605
CD206	C068C2	Alexa488
CD11b	M1/70	BV650
CD45	104	PE-Cy7
Ly6G	1A8	APC-Cy7
Ly6C	HK1.4	PE-CF594
CX3CR1	SA011F11	PE
F4/80	BM8	PE-Cy5
CD23	B3B4	Alexa700

[0249]

표 10

표 10

단핵구 패널		
마커	클론	형광단
CD3	500A2	Alexa700
CD19	6D5	Alexa488
CD4	GK1.5	APC-Cy7
CD8	43-6.7	BV650
CD62L	MEL-14	BV605
CD44	IM7	PE
CD45	104	PE-Cy7
CCR7	4B12	PE-Cy5
CD127	A7R34	BV711
MHCII	M5/114.15.2	BV510
CD38	90	Alexa647
CCR6	BV421	29-2L17
CXCR3	CXCR3-173	PE-CF594

[0250]

[0251] 실시예 3. 비장 면역 세포 집단. 결과는 도 35a 및 도 35b에 도시된다. 염증성 상태를 특징으로 하는 염증성 세포 집단은 대조군 4 주령 및 8 주령 야생형 및 파버 마우스 비장으로부터 분석되었다. Ly6GCD11b 이중 양성 $CD45^+$ 호중구 및 $CD11b^+MHCII^-$ $CD45^+$ 활성화된 단핵구의 집단은 4주에 걸쳐 총 4 개 용량에 대해 3 주령에서 시작하여 매주 1회 10 mg/kg/용량 RVT-801로 투여받은 7 주령 파버 마우스로부터 결정되었다. 연령-매칭된 파버 마우스 및 한배새끼 대조군(WT)의 비장에서 면역 세포의 빈도의 배수 변화 차이의 히트맵(heat map) 분석이다. 각각의 컬럼은 개별 동물을 나타낸다. 배수 변화는 평균적 WT 값을 1로 설정함으로써 계산되었다.

[0252] 실시예 4. 전신 (혈액) 면역 세포 집단. 결과는 도 36a 내지 도 36c에 도시된다. 염증성 상태의 염증성 세포 집단 특징은 대조군 4 주령 및 8 주령 야생형 및 파버 마우스 혈액 시료로부터 분석되었다. Ly6G, CD11b 이중 양성 $CD45^+$ 호중구 및 $CD11b^+MHCII^-$ $CD45^+$ 활성화된 단핵구의 집단은 4주에 걸쳐 총 4 개 용량에 대해 3 주령에서 시작하여 매주 1회 10 mg/kg/용량 RVT-801로 투여받은 7 주령 파버 마우스로부터 결정되었다. 연령-매칭된 파버 마우스 및 한배새끼 대조군(WT)의 혈액에서 면역 세포의 빈도의 배수 변화 차이의 히트맵 분석이다. 각각의 컬럼은 개별 동물을 나타낸다. 배수 변화는 평균적 WT 값을 1로 설정함으로써 계산되었다.

[0253] 실시예 5. 폐 면역 세포 집단. 결과는 도 37a 내지 도 37d에 도시된다. 염증성 상태의 염증성 세포 집단 특징은 대조군 4 주령 및 8 주령 야생형 및 파버 마우스 폐 조직으로부터 분석되었다. Ly6G, CD11b 이중 양성 CD45+ 호중구 및 CD11b+MHCII-CD45+ 활성화된 단핵구의 집단은 4주에 걸쳐 총 4 개 용량에 대해 3 주령에서 시작하여 매주 1회 10 mg/kg/용량 RVT-801로 투여받은 7 주령 파버 마우스로부터 결정되었다. 연령-매칭된 파버 마우스 및

한배새끼 대조군(WT)의 폐에서 면역 세포의 빈도의 배수 변화 차이의 히트맵 분석이다. 각각의 컬럼은 개별 동물을 나타낸다. 배수 변화는 평균적 WT 값을 1로 설정함으로써 계산되었다. 도 37c에 또한 보고된 것은 CD45+Ly6C-MHCII+CD11b-인 부가적인 대식세포 집단이다.

[0254] 실시예 6. 간 면역 세포 집단. 결과는 도 38a 내지 도 38b에 도시된다. 염증성 상태의 염증성 세포 집단 특징은 대조군 4 주령 및 8 주령 야생형 및 파버 마우스 간 조직으로부터 분석되었다. Ly6G/CD11b 이중 양성 CD45+ 호중구 및 CD11b+ hiMHCII- CD45+ 활성화된 단핵구의 집단은 4주에 걸쳐 총 4 개 용량에 대해 3 주령에서 시작하여 매주 1회 10 mg/kg/용량 RVT-801로 투여받은 7 주령 파버 마우스로부터 결정되었다.

[0255] 그 전문이 참조에 의해 포함된 출원에서 논의된 참조문헌은 이들의 의도된 목적을 위한 것이며, 이의 맥락에 기초하여 분명하다.

[0257] Alayoubi, A.M., J.C. Wang, B.C. Au, S. Carpentier, V. Garcia, S. Dworski, S. El-Ghamrasni, K.N. Kirouac, M.J. Exertier, Z.J. Xiong, G.G. Prive, C.M. Simonaro, J. Casas, G. Fabrias, E.H. Schuchman, P.V. Turner, R. Hakem, T. Levade, and J.A. Medin (2013). Systemic ceramide accumulation leads to severe and varied pathological consequences. EMBO Mol Med, 5:827-842.

[0258] Bae, J.S., Jang, K.H., Schuchman, E.H., and Jin, H.K. (2004). Comparative effects of recombinant acid sphingomyelinase administration by different routes in Niemann-Pick disease mice. Exp Anim, 53:417-421.

[0259] Becker, K.A., Riethuller, J., Luth, A., Doring, G., Kleuser, B., and Gulbins, E. (2010). Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide and Inflammation in Cystic Fibrosis. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 42(6):716-724.

[0260] Bernardo, K., R. Hurwitz, T. Zenk, R.J. Desnick, K. Ferlinz, E.H. Schuchman, and K. Sandhoff (1995). Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. J Biol Chem, 270:11098-11102.

[0261] Boado, R.J., Lu, J.Z., Hui, E.K., Lin, H., and Pardridge, W.M. (2016). Insulin receptor antibody-alpha-N-acetylglucosaminidase fusion protein penetrates the primate blood-brain barrier and reduces glycosaminoglycans in Sanfillippo type B fibroblasts. Mol. Pharm., 13:1385-92.

[0262] Chatelut, M., Harzer, K., Christomanou, H., Feunteun, J., Pieraggi, M.T., Paton, B.C., Kishimoto, Y., O'Brien, J.S., Basile, J.P., Thiers, J.C., Salvayre, R., and Levade, T. (1997). Model SV40-transformed fibroblast lines for metabolic studies of human prosaposin and acid ceramidase deficiencies. Clin Chim Acta, 262:61-76.

[0263] Desnick, R.J. and Schuchman, E.H. (2012). Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. Annu Rev Genomics Hum Genet, 13:307-335.

[0264] Dworski, S., Berger, A., Furlonger, C., Moreau, J.M., Yoshimitsu, M., Trentadue, J., Au, B.C., Paige, C.J., and Medin, J.A. (2015). Markedly perturbed hematopoiesis in acid ceramidase deficient mice. Haematologica, 100(5):e162-165.

[0265] Dworski, S., Lu, P., Khan, A., Maranda, B., Mitchell, J.J., Parini, R., Di Rocco, M., Hugle, B., Yoshimitsu, M., Magnusson, B., Makay, B., Arslan, N., Guelbert, N., Ehlert, K., Jarisch, A., Gardner-Medwin, J., Dagher, R., Terreri, M.T., Lorenco, C.M., Barillas-Arias, L., Tanpaiboon, P., Solyom, A., Norris, J.S., He, X., Schuchman, E.H., Levade, T., and Medin, J.A. (2017). Acid Ceramidase Deficiency is characterized by a unique plasma cytokine and ceramide profile that is altered by therapy. Biochim Biophys Acta, 1863(2):386-394 (Epub Dec. 2016 doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.031).

[0266] Eliyahu, E., Park, J.H., Shtraizent, N., He, X., and Schuchman, E.H. (2007). Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. FASEB J., 21:1403-9.

[0267] Eliyahu, E., N. Shtraizent, K. Martinuzzi, J. Barritt, X. He, H. Wei, S. Chaubal, A.B. Copperman, and E.H. Schuchman (2010). Acid ceramidase improves the quality of oocytes and embryos and the outcome of

in vitro fertilization. FASEB J, 24:1229-1238.

[0268] Eliyahu, E., N. Shtraizent, R. Shalgi and E.H. Schuchman (2012). Construction of conditional acid ceramidase knockout mice and in vivo effects on oocyte development and fertility. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 30:735-748.

[0269] Farber, S. (1952) A lipid metabolic disorder — disseminated "Lipogranulomatosis" — a syndrome with similarity to, and important difference from, Niemann-Pick and Hand-Schuller-Christian disease. Am. J. Dis. Child, 84:499.

[0270] Frohbergh, M.E., Guevara, J.M., Greisamer, R.P., Barbe, M.F., He, X., Simonaro, C.M., and Schuchman, E.H. (2016). Acid ceramidase treatment enhances the outcome of autologous chondrocyte implantation in a rat osteochondral defect model. Osteoarthritis Cartilage, 24:752-762.

[0271] Gatt, S. (1963). Enzymic hydrolysis and synthesis of ceramides. J Biol Chem, 238:3131-3133.

[0272] He, X., N. Okino, R. Dhami, A. Dagan, S. Gatt, H. Schulze, K. Sandhoff, and E.H. Schuchman (2003). Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. J Biol Chem, 278(35):32978-32986.

[0273] He et al. (2017). Enzyme replacement therapy for Farber disease: Proof-of-concept studies in cells and mice," BBA Clin. 2017 Feb 13; 7:85-96.

[0274] Hollak, C.E. and Wijburg, F.A. (2014). Treatment of lysosomal storage disorders: successes and challenges. J Inherit Metab Dis, 37:587-598.

[0275] Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, Jd.D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., and Guerau-de-Arellano, M. (2015). Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. PLoS ONE 10(12):e0145342.

[0276] Koch, J., S. Gartner, C.M. Li, L.E. Quintern, K. Bernardo, O. Levran, D. Schnabel, R.J. Desnick, E.H. Schuchman, and K. Sandhoff (1996). Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase. Identification of the first molecular lesion causing Farber disease. J Biol Chem, 271(51):33110-33115.

[0277] Jun Kunisawa, Yosuke Kurashima, Morio Higuchi, Masashi Gohda, Izumi Ishikawa, Ikuko Ogahara, Namju Kim, Miki Shimizu, and Hiroshi Kiyono (2007). Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium, JEM, 204 (10): 2335-2348.

[0278] Li, C.M., J.H. Park, X. He, B. Levy, F. Chen, K. Arai, D.A. Adler, C.M. Disteche, J. Koch, K. Sandhoff, and E.H. Schuchman (1999). The human acid ceramidase gene (asah): Structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. Genomics, 62(2):223-231.

[0279] Li, C.M., S.B. Hong, G. Kopal, X. He, T. Linke, W.S. Hou, J. Koch, S. Gatt, K. Sandhoff, and E.H. Schuchman (1998). Cloning and characterization of the full-length cDNA and genomic sequences encoding murine acid ceramidase. Genomics, 50(2):267-274.

[0280] Li, C.M., J.H. Park, C.M. Simonaro, X. He, R.E. Gordon, A.H. Friedman, D. Ehleiter, F. Paris, K. Manova, S. Hepbildikler, Z. Fuks, K. Sandhoff, R. Kolesnick, and E.H. Schuchman (2002). Insertional mutagenesis of the mouse acid ceramidase gene leads to early embryonic lethality in homozygotes and progressive lipid storage disease in heterozygotes. Genomics, 79(2):218-224.

[0281] Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GRS, and Perlman H (2013). Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung, Am J Respir Cell Mol Biol, 49 (4): 503—510.

[0282] Murray JM, Thompson, AM, Vitsky A, Hawes M, Chuang WL, Pacheco J, Wilson S, McPherson JM, Thurberg BL, Karey KP, and Andrews L. (2015). Nonclinical safety assessment of recombinant human acid

sphingomyelinase (rhASM) for the treatment of acid sphingomyelinase deficiency: the utility of animal models of disease in the toxicology evaluation of potential therapeutics. Mol Genet Metab, 114:217-225.

[0283] Okino, N., He, X., S. Gatt, K. Sandhoff, M. Ito, and E.H. Schuchman (2003). The reverse activity of human acid ceramidase. J Biol Chem, 278(32):29948-29953.

[0285] Realini, N., Palese, F., Pizzirani, D., Pontis, S., Basit, A., Bach, A., Ganesan, A., and Piomelli, D. (2015). Acid ceramidase in melanoma: expression, localization and effects of pharmacological inhibition. J Biol Chem, N291:2422-2434.

[0286] Roh, J.L., Park, J.Y., Kim, E.H., and Jang, H.J. (2016). Targeting acid ceramidase sensitises head and neck cancer to cisplatin. Eur J Cancer, 52:163-72.

[0287] Shiffmann, S., Hartmann, D., Birod, K., Ferreiros, N., Schreiber, Y., Zivkovic, A., Geisslinger, G., Grosch, S., and Stark, H. (2012). Inhibitors of Specific Ceramide Synthases. Biochimie, 94(2):558-565.

[0288] Schuchman, E.H. (2016). Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases. The expanding role of enzyme replacement therapy. Biochim Bipphys Acta, 1862:1459-1471.

[0289] Simonaro, C.M., Sachot, S., Ge, Y., He, X., DeAngelis, V.A., Eliyahu, E., Leong, D.J., Sun, H.B., Mason, J.B., Haskins, M.E., Richardson, D.W., and Schuchman, E.H. (2013). Acid ceramidase maintains the chondrogenic phenotype of expanded primary chondrocytes and improves the chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. PLoS One, 8:e62715.

[0291] Shtraizent, N., E. Eliyahu, J.H. Park, X. He, R. Shalgi and E.H. Schuchman (2008). Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase. J Biol Chem, 283(17):11253-11259.

[0292] Sugita, M., Dulaney, J.T., and Moser, HW (1972). Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). Science, 178(4065):1100-1102.

[0293] Yu FP, Islam D, Sikora J, Dworski S, Gurka' J, Lopez-Vasquez L, Liu M, Kuebler WM, Levade T, Zhang H, Medin JA (2017). Chronic lung injury and impaired pulmonary function in a mouse model of acid ceramidase deficiency, Press. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (November 22, 2017, Epub ahead of print).

[0294] 본원에서 인용된 각각의 그리고 모든 특허, 특허 출원, 공개 및 기탁 번호의 개시내용은 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0295] 본 개시내용이 다양한 구현예를 참조로 하여 개시되긴 하였지만, 다른 구현예 및 이들의 변동은 본 개시내용의 참(true) 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 당업자에 의해 고안될 수 있음이 분명하다. 첨부된 청구항은 모든 이러한 구현예 및 동등한 변동을 포함하는 것으로 간주되고자 한다.

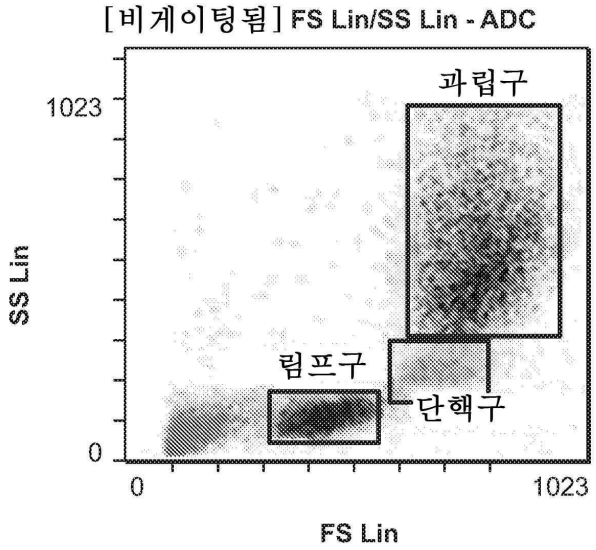
[0296] **등가물**

[0297] 상기 기재된 명세서는 당업자가 구현예를 실행할 수 있게 하기에 충분한 것으로 여겨진다. 상기 상세한 설명 및 실시예는 소정의 구현예를 상술하고, 발명자들에 의해 고려되는 최상의 모드를 기재한다. 그러나, 상기의 내용이 맥락에서 얼마나 상세히 나타날 수 있더라도, 구현예는 많은 방식으로 실행될 수 있고, 첨부된 청구항 및 이의 임의의 등가물에 따라 간주되어야 하는 것으로 이해될 것이다.

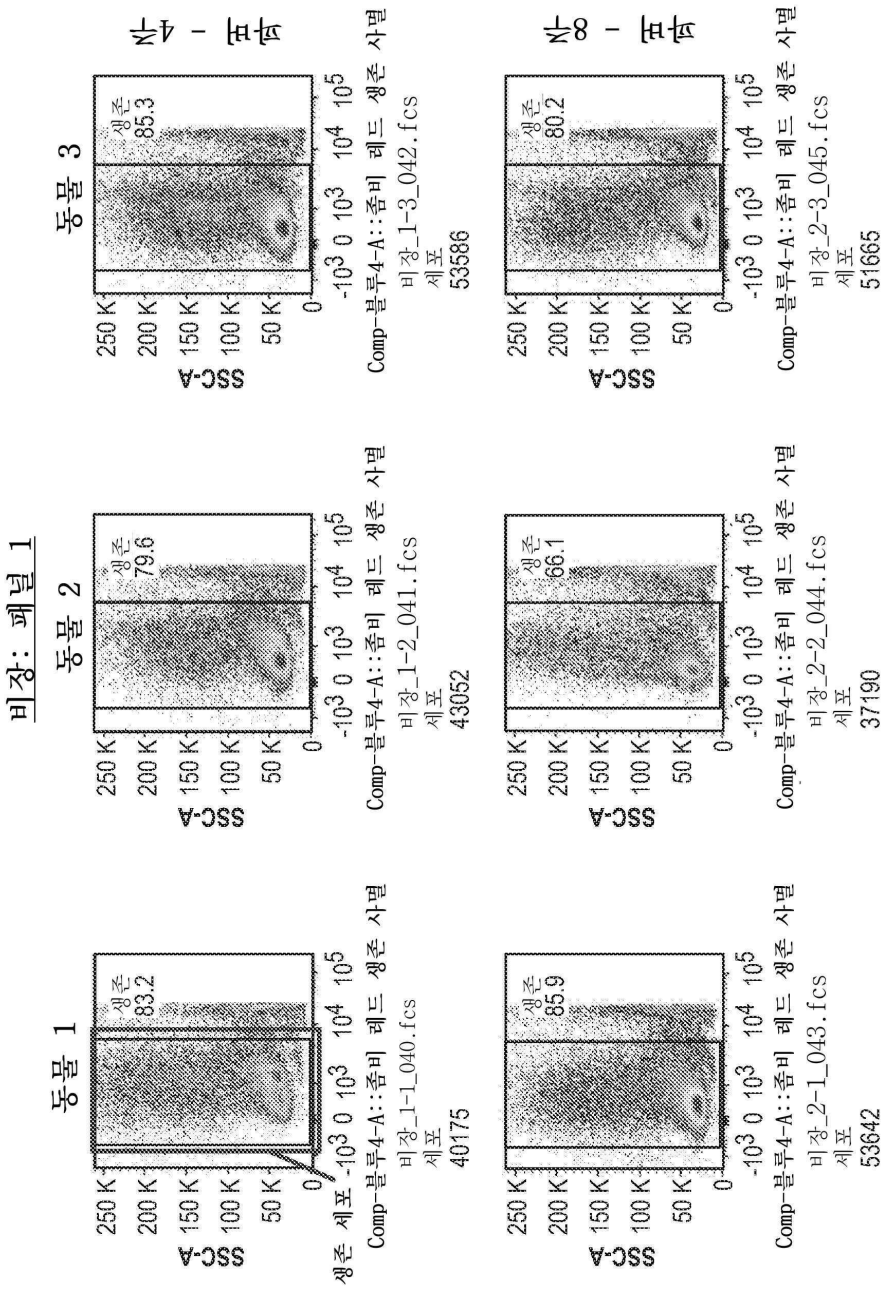
[0298] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 약(about)은 명료하게 지시되거나 그렇지 않든 간에, 예를 들어, 정수, 분수 및 퍼센트를 포함한 수치를 지칭한다. 용어 약은 일반적으로, 당업자가 언급된 값과 동등한(예를 들어, 동일한 기능 또는 결과를 갖는) 것으로 여길 수치 범위(예를 들어, 언급된 범위의 +/-5-10%)를 지칭한다. 적어도 및 약과 같은 용어가 수치 또는 범위의 목록 앞에 놓인 경우, 상기 용어는 목록에 제공된 모든 값 또는 범위를 수식한다. 일부 경우, 용어 약은 가장 가까운 유효 숫자로 반올림된 수치를 포함할 수 있다.

도면

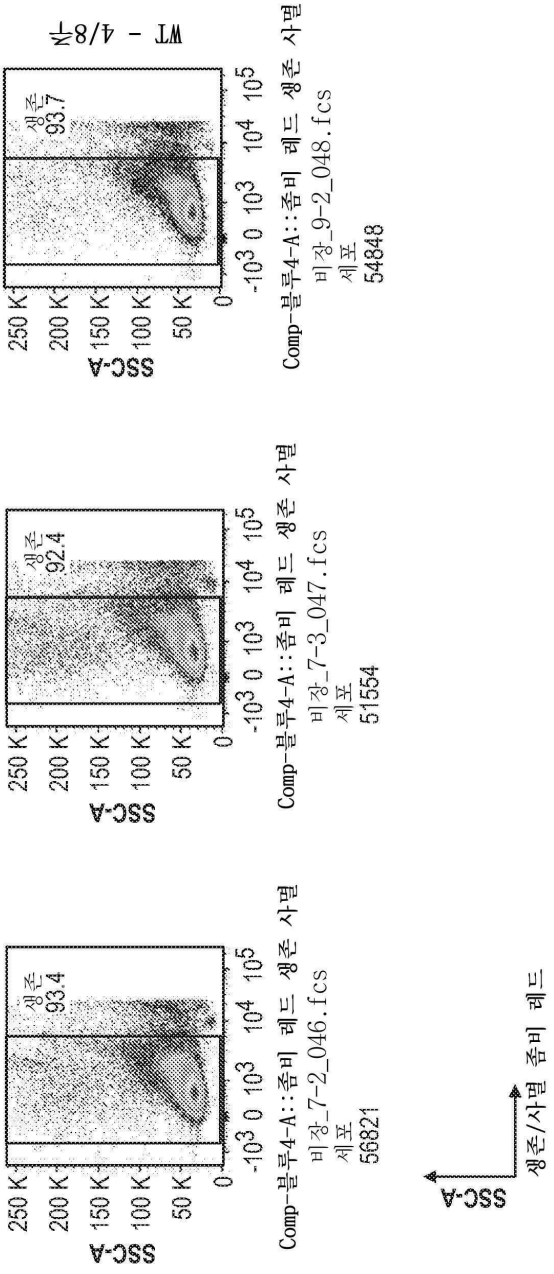
도면1



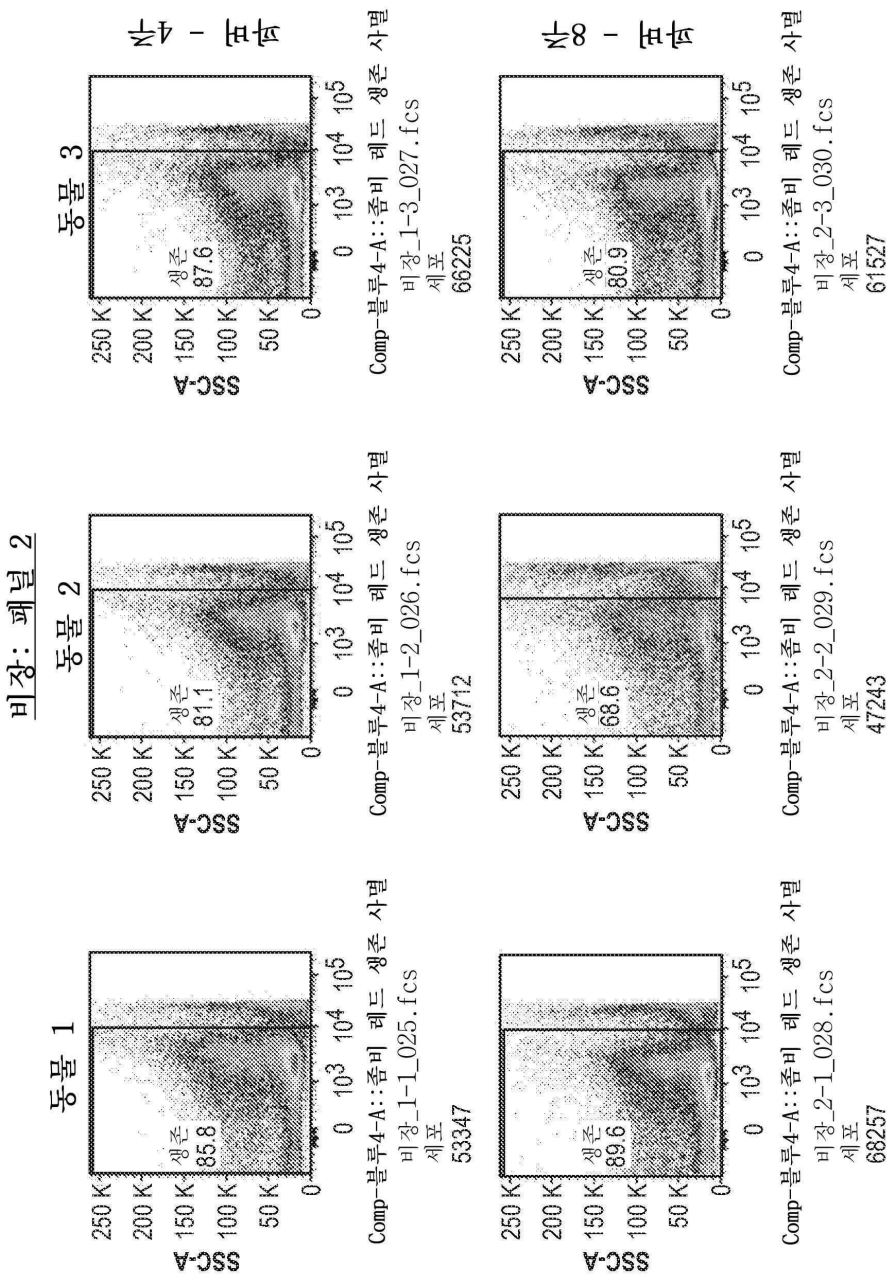
도면2aa


비장: 패널 1
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
생존
83.2
79.6
85.3
85.9
66.1
80.2
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
생존 세포
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_1-1_040.fcs
세포
40175
비장_1-2_041.fcs
43052
비장_1-3_042.fcs
53586
비장_2-1_043.fcs
53642
비장_2-2_044.fcs
37190
비장_2-3_045.fcs
51665

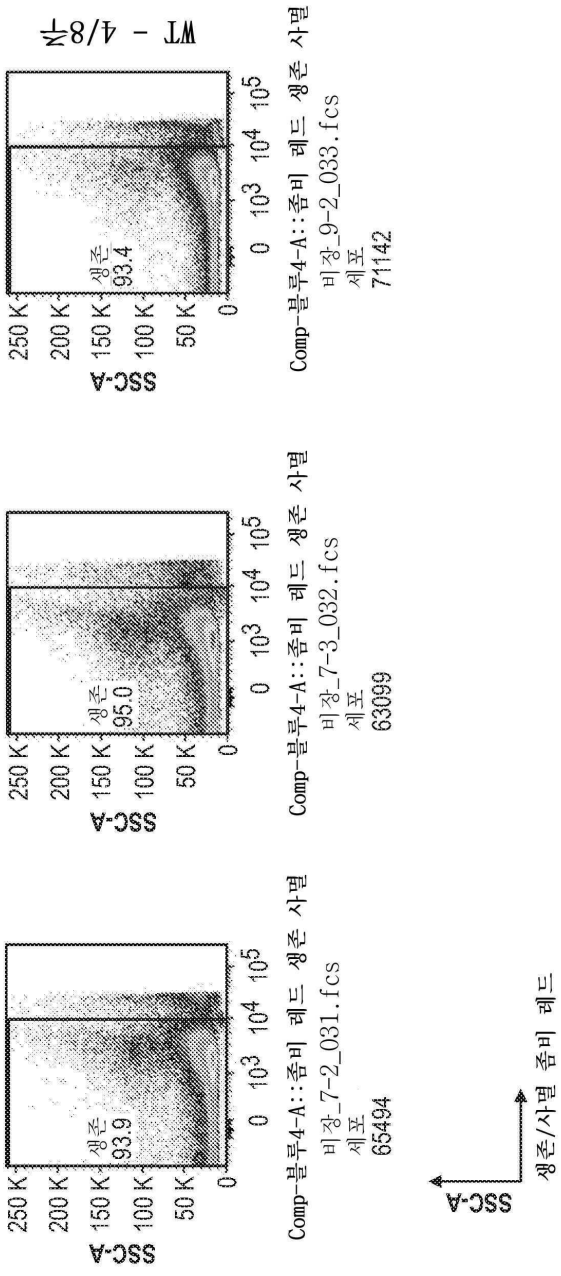
도면2ab


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
생존
93.4
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_7-2_046.fcs
세포
56821
생존
92.4
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_7-3_047.fcs
세포
51554
생존
93.7
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_9-2_048.fcs
세포
54848
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

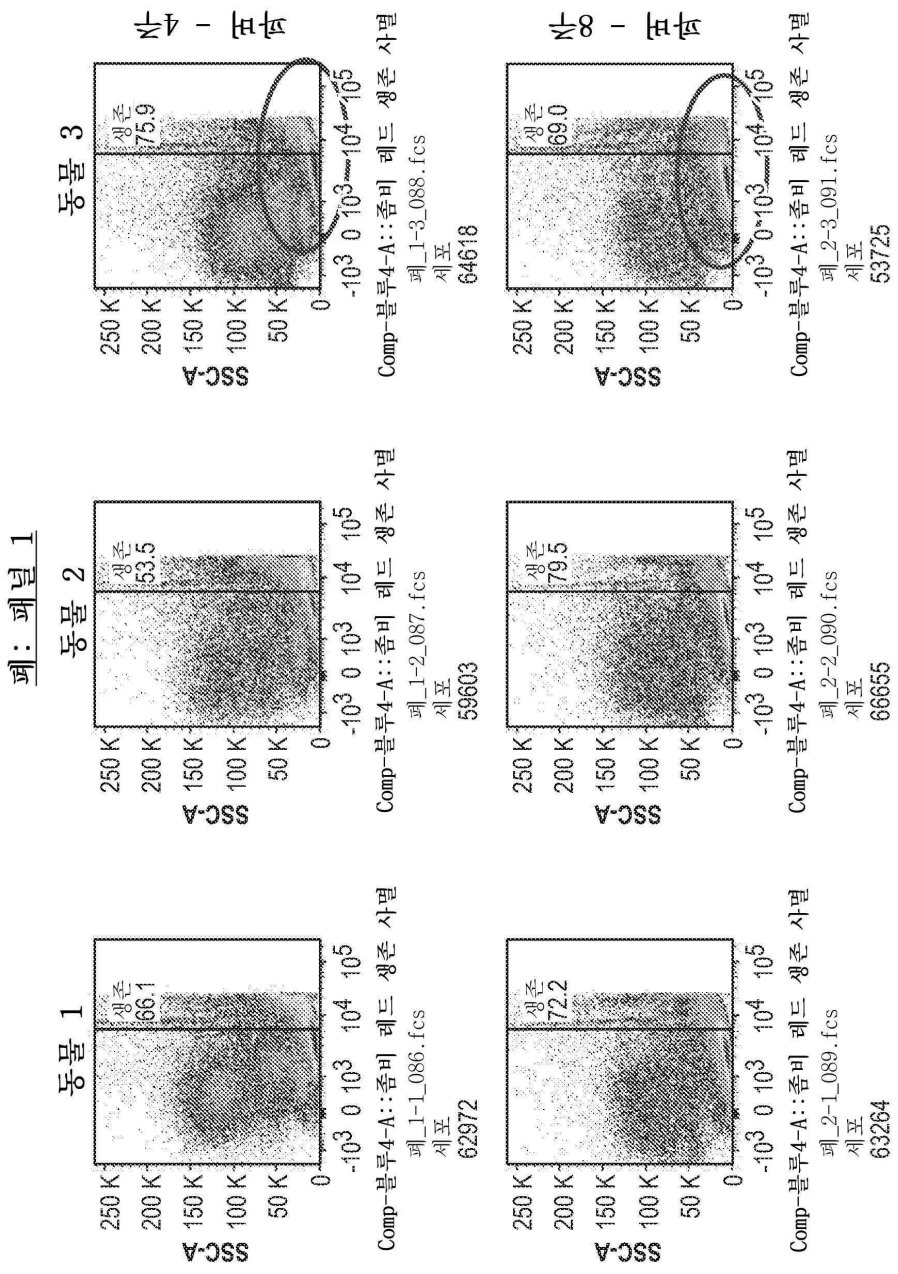
도면2ba


비장: 패널 2
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
85.8
81.1
87.6
89.6
68.6
80.9
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_1-1_025.fcs
비장_1-2_026.fcs
비장_1-3_027.fcs
비장_2-1_028.fcs
비장_2-2_029.fcs
비장_2-3_030.fcs
세포
53347
53712
66225
68257
47243
61527

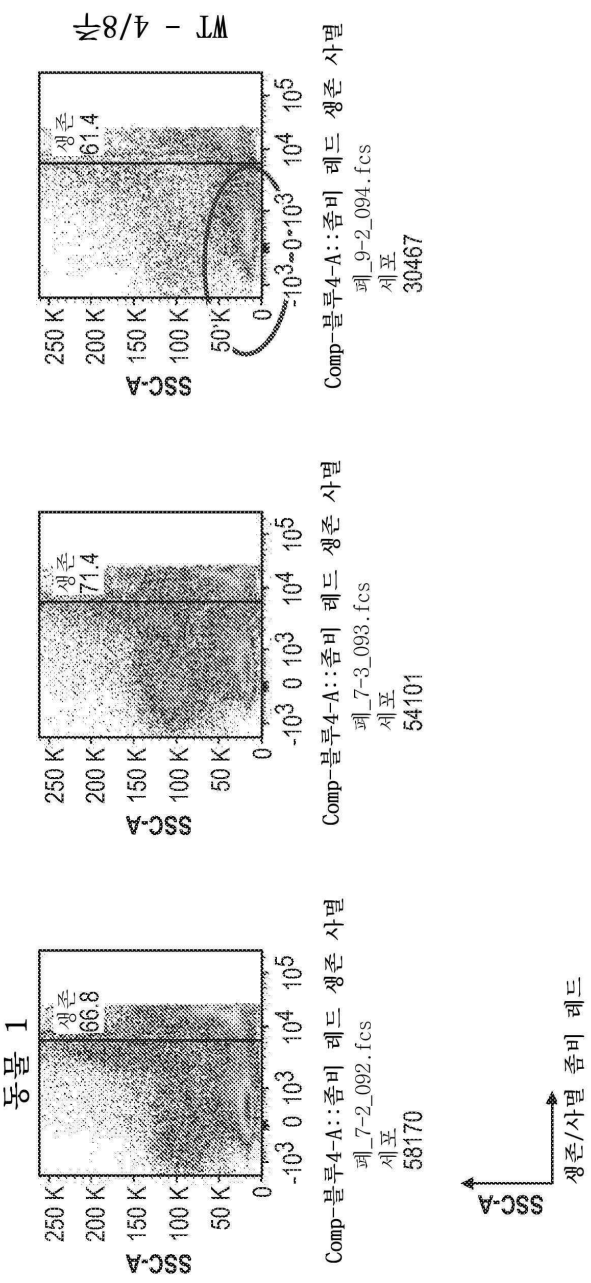
도면2bb


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
93.4
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_9-2_033.fcs
세포
71142
생존
95.0
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_7-3_032.fcs
세포
63099
생존
93.9
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
비장_7-2_031.fcs
세포
65494
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

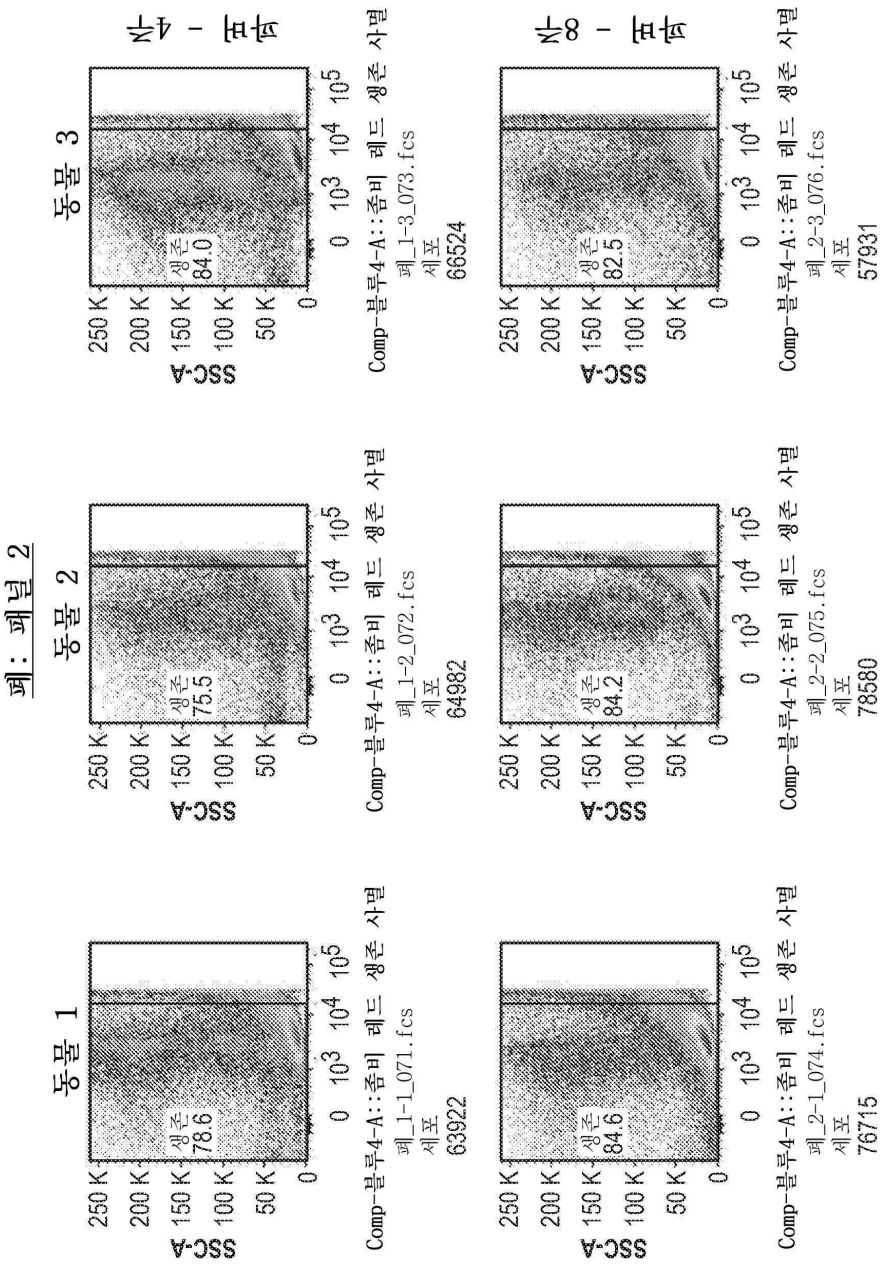
도면3aa


폐 : 폐늴 1
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
생존
66.1
53.5
75.9
79.5
72.2
69.0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
폐_1-1_086.fcs
폐_1-2_087.fcs
폐_1-3_088.fcs
폐_2-1_089.fcs
폐_2-2_090.fcs
폐_2-3_091.fcs
세포
62972
59603
64618
63264
66655
53725

도면3ab


동물 1
WT - 4/8주
SSC-A
생존
66.8
71.4
61.4
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
50'K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
-10^3~0~10^3
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
폐_7-2_092.fcs
폐_7-3_093.fcs
폐_9-2_094.fcs
세포
58170
54101
30467
생존/사멸 좀비 레드

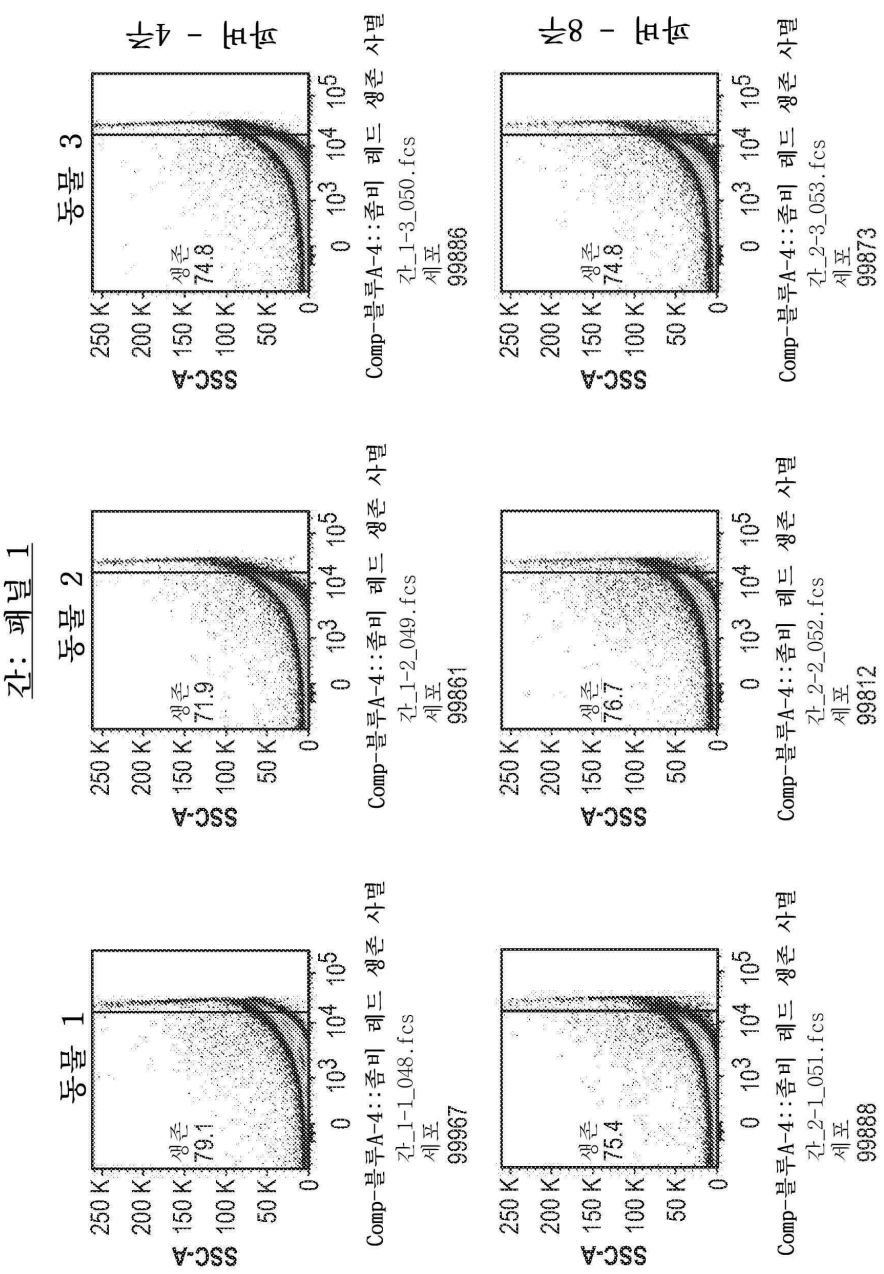
도면3ba


폐: 폐널 2
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
78.6
75.5
84.0
84.6
84.2
82.5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
폐_1-1_071.fcs
폐_1-2_072.fcs
폐_1-3_073.fcs
폐_2-1_074.fcs
폐_2-2_075.fcs
폐_2-3_076.fcs
세포
63922
64982
66524
76715
78580
57931

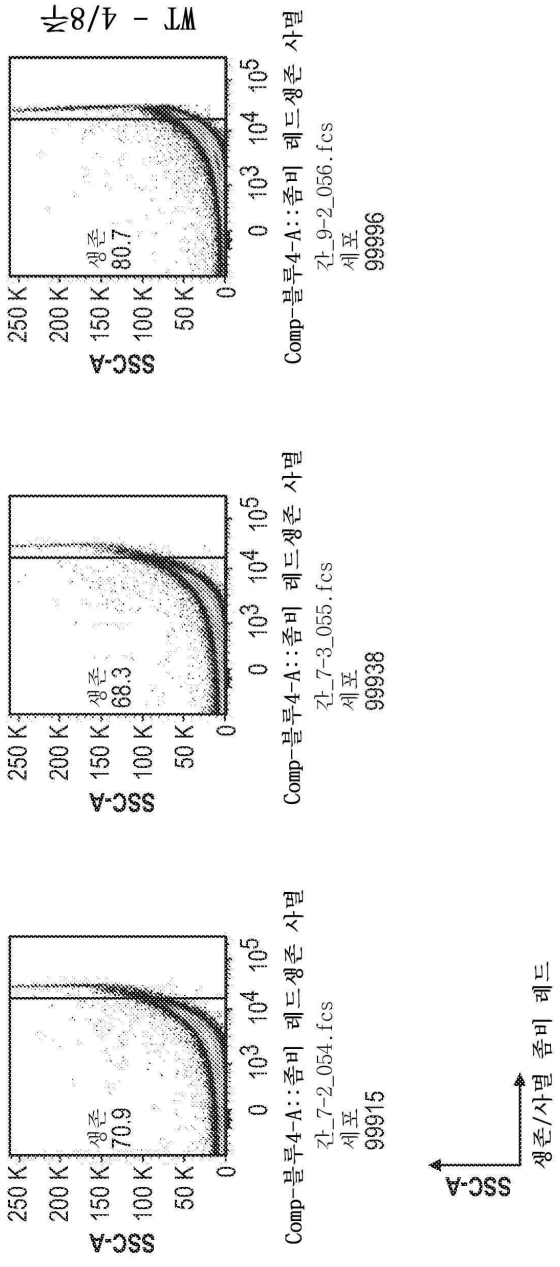
도면3bb

WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
56.4
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
폐_9-2_079.fcs
세포
34406
생존
61.1
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
폐_7-3_078.fcs
세포
53804
생존
55.1
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
폐_7-2_077.fcs
세포
51404
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

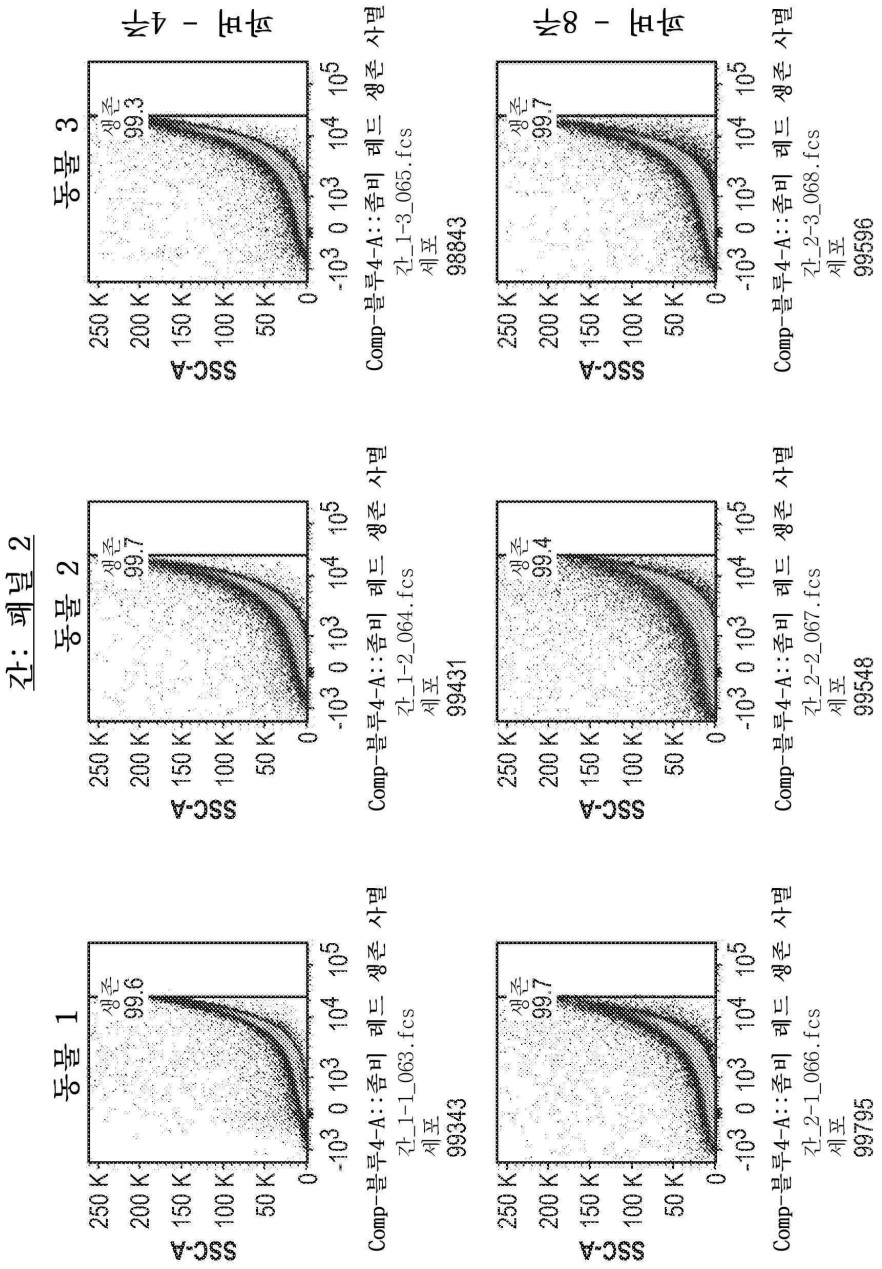
도면4aa


간: 패널 1
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
79.1
71.9
74.8
76.7
75.4
Comp-블루A-4::좀비 레드 생존 사멸
간_1-1_048.fcs
간_1-2_049.fcs
간_1-3_050.fcs
간_2-1_051.fcs
간_2-2_052.fcs
간_2-3_053.fcs
세포
99967
99861
99886
99888
99812
99873

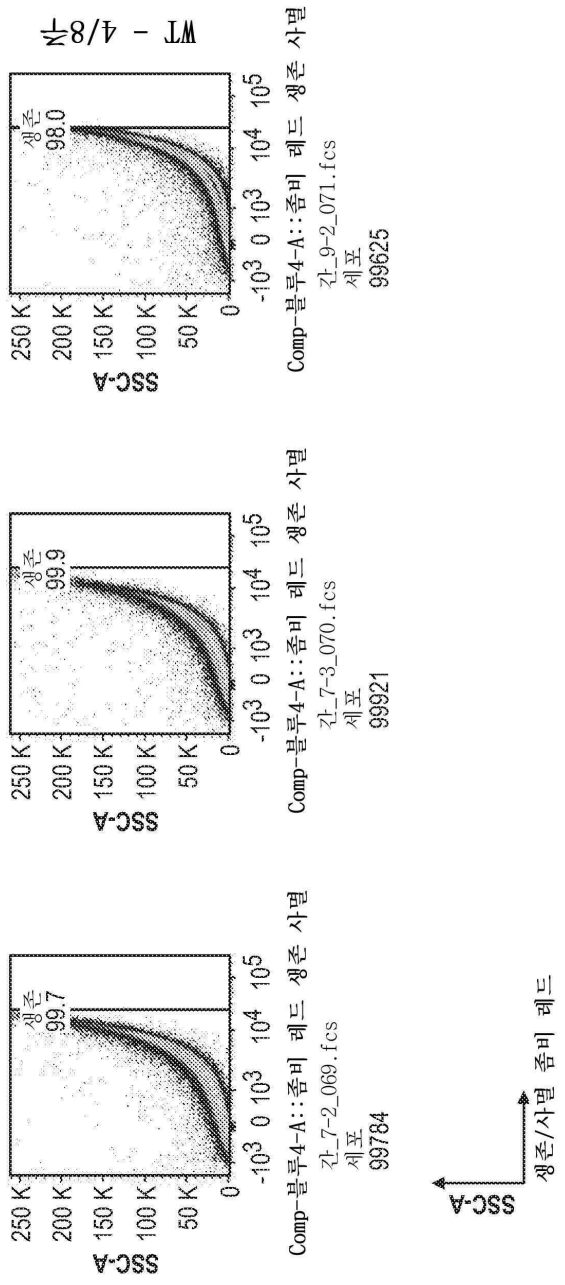
도면4ab


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
80.7
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
간_9-2_056.fcs
세포
99996
생존
68.3
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
간_7-3_055.fcs
세포
99938
생존
70.9
Comp-블루4-A::좀비 레드생존 사멸
간_7-2_054.fcs
세포
99915
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

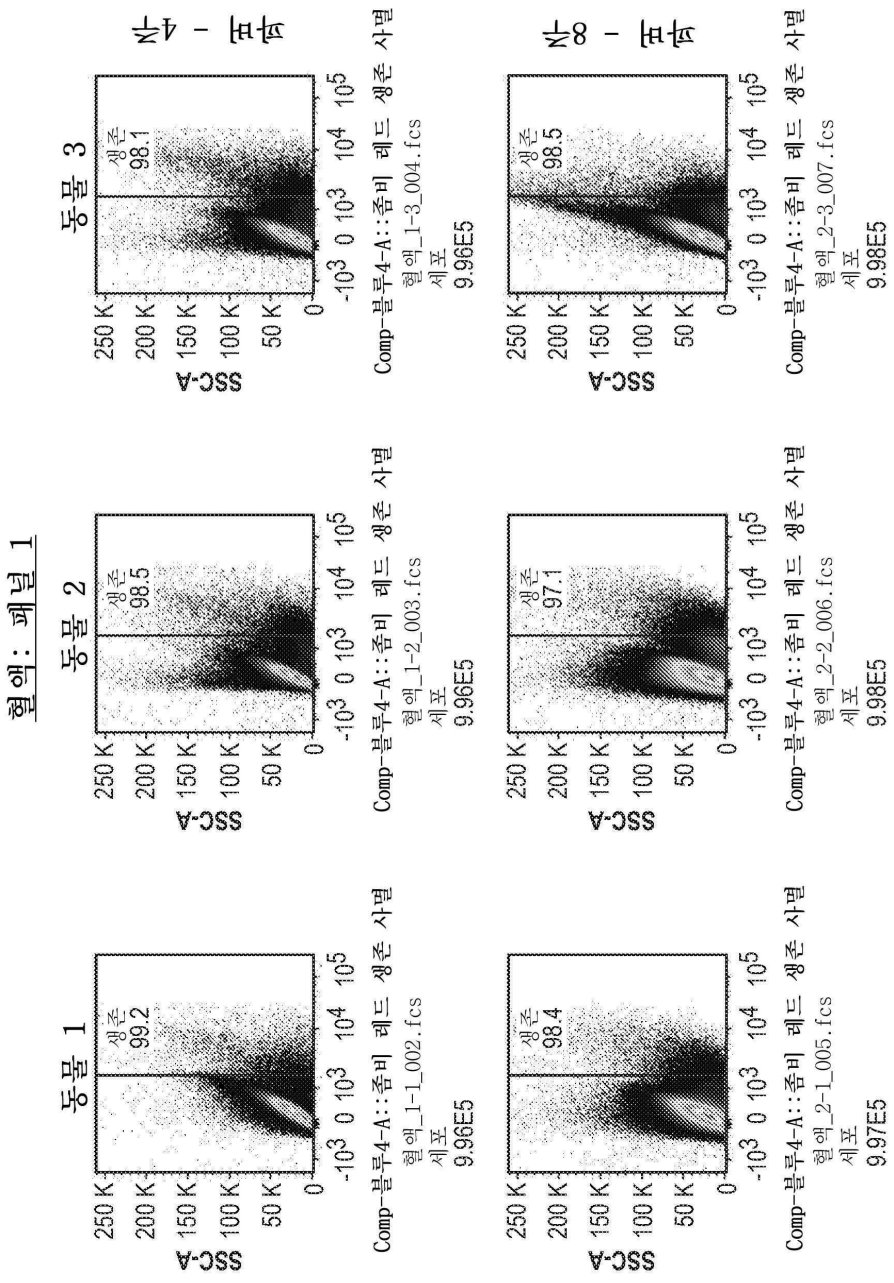
도면4ba


간: 패널 2
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
생존
99.6
99.7
99.3
99.4
99.7
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
간_1-1_063.fcs
세포
99343
간_1-2_064.fcs
99431
간_1-3_065.fcs
98843
간_2-1_066.fcs
99795
간_2-2_067.fcs
99548
간_2-3_068.fcs
99596

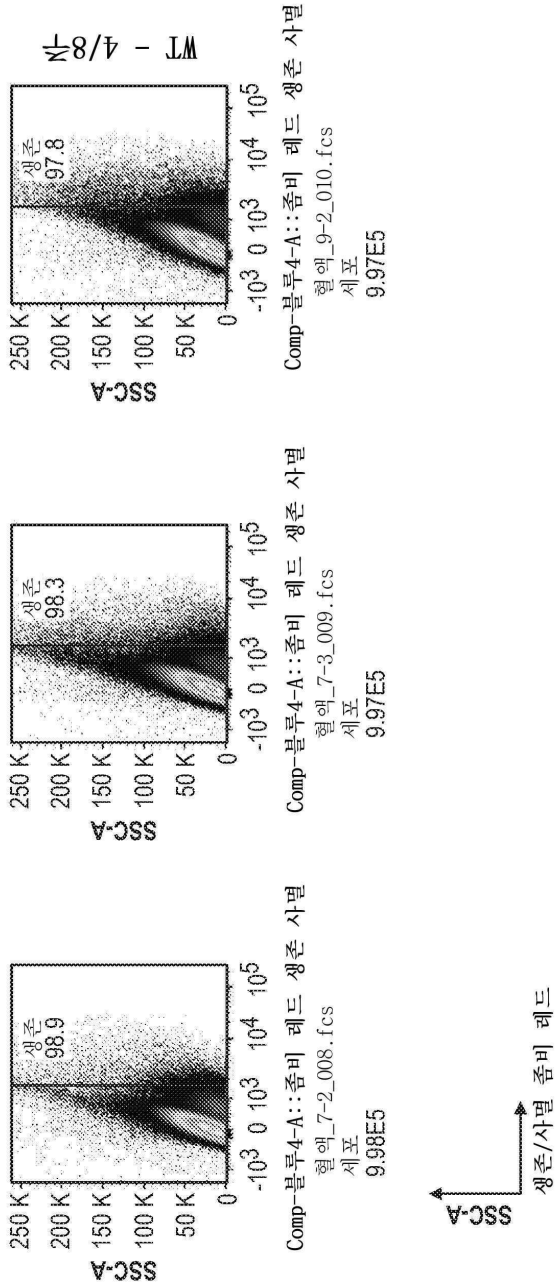
도면4bb


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
생존
98.0
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
간_9-2_071.fcs
세포
99625
생존
99.9
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
간_7-3_070.fcs
세포
99921
생존
99.7
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
간_7-2_069.fcs
세포
99784
생존/사멸 좀비 레드

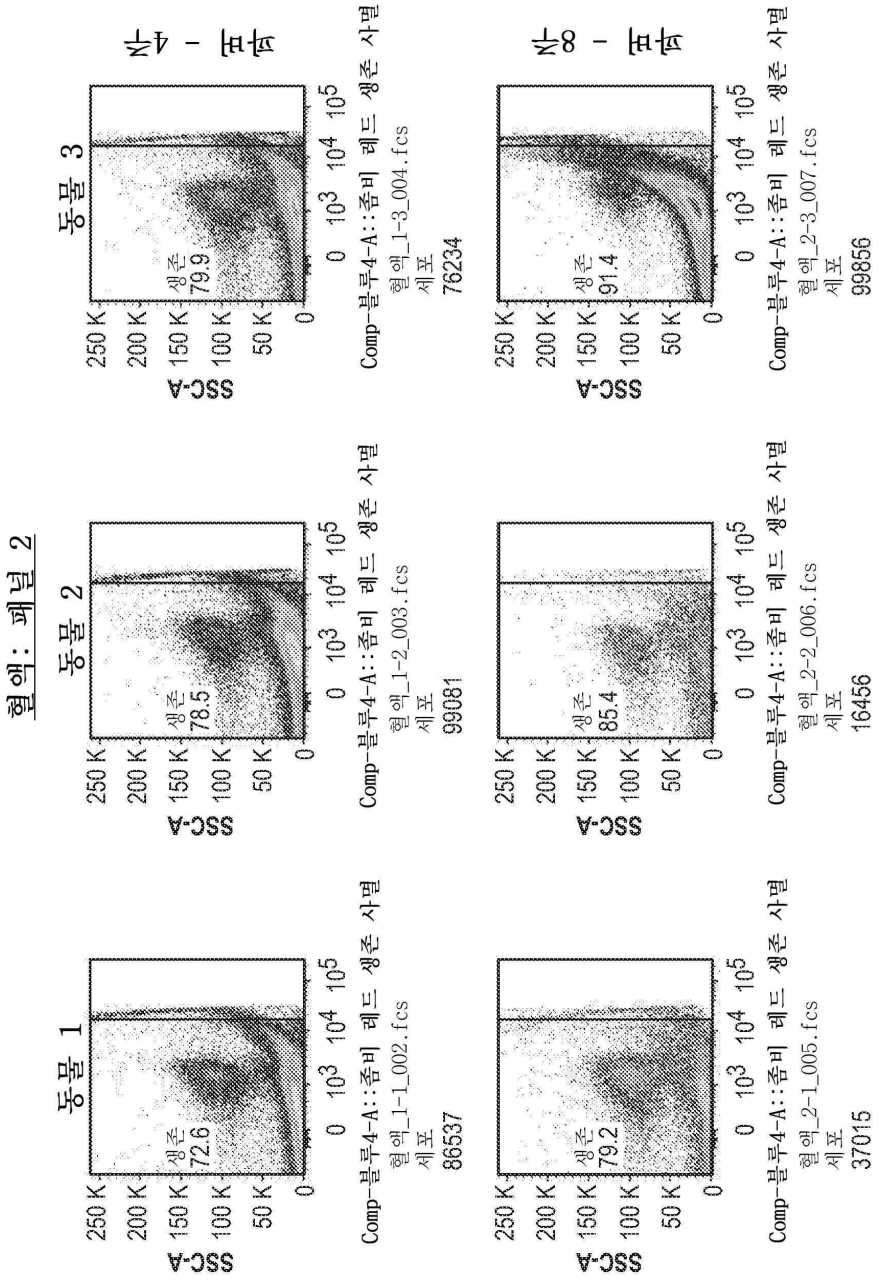
도면5aa


혈액: 패널 1
동물 1
동물 2
동물 3
팍버 - 4주
팍버 - 8주
생존
99.2
98.5
98.1
97.1
98.4
98.5
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
혈액_1-1_002.fcs
혈액_1-2_003.fcs
혈액_1-3_004.fcs
혈액_2-1_005.fcs
혈액_2-2_006.fcs
혈액_2-3_007.fcs
세포
9.96E5
9.97E5
9.98E5

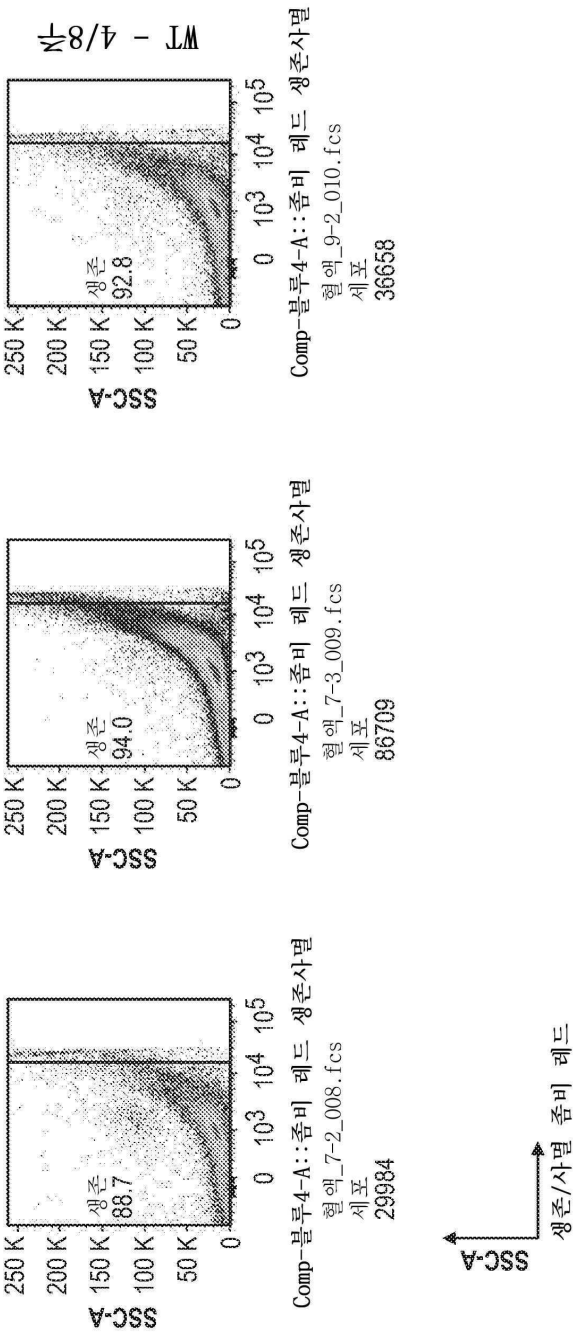
도면5ab


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
생존
97.8
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
혈액_9-2_010.fcs
세포
9.97E5
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
생존
98.3
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
혈액_7-3_009.fcs
세포
9.97E5
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
생존
98.9
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
혈액_7-2_008.fcs
세포
9.98E5
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

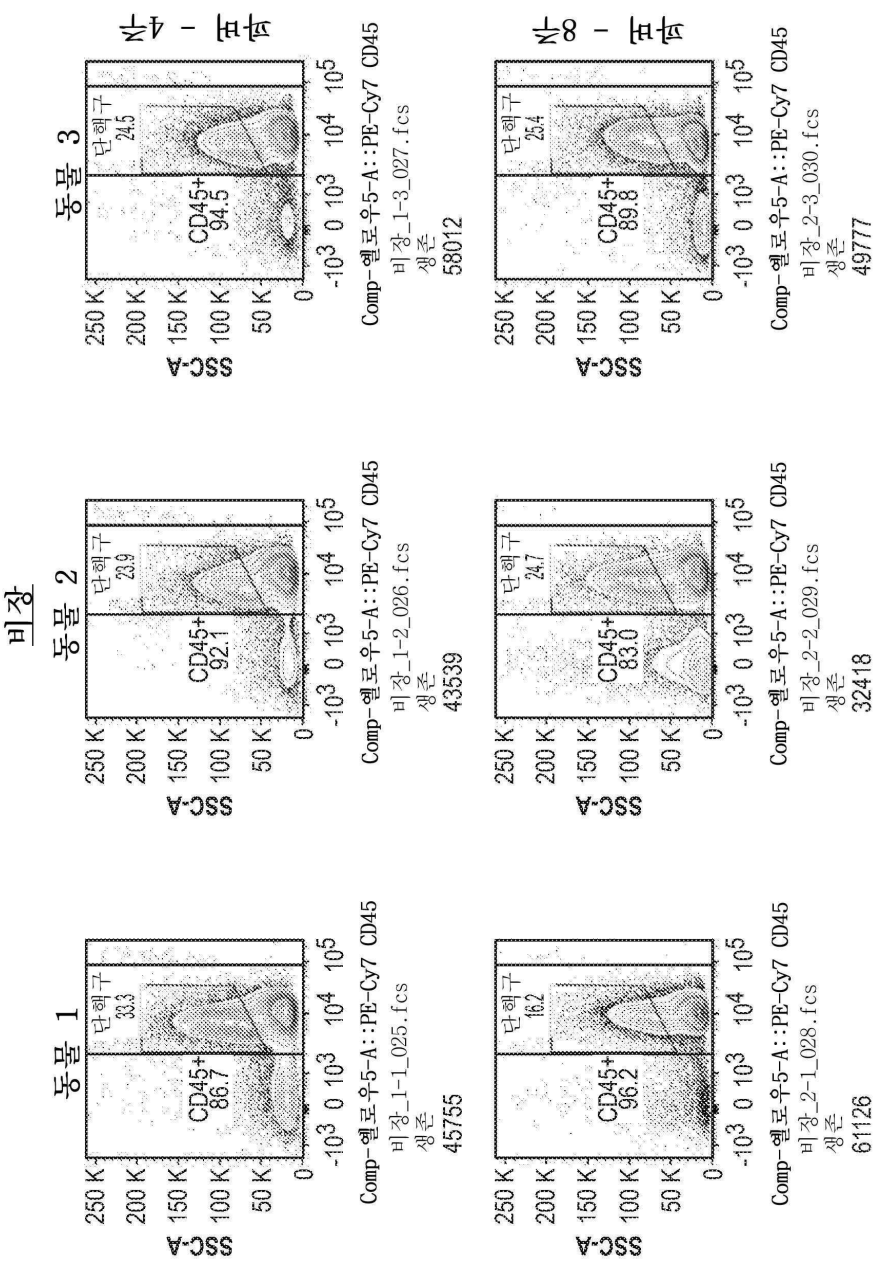
도면5ba


혈액 : 패널 2
동물 1
동물 2
동물 3
피부 - 4주
피부 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
생존
72.6
78.5
79.9
79.2
85.4
91.4
0 10^3 10^4 10^5
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
혈액_1-1_002.fcs
세포
86537
혈액_1-2_003.fcs
세포
99081
혈액_1-3_004.fcs
세포
76234
혈액_2-1_005.fcs
세포
37015
혈액_2-2_006.fcs
세포
16456
혈액_2-3_007.fcs
세포
99856

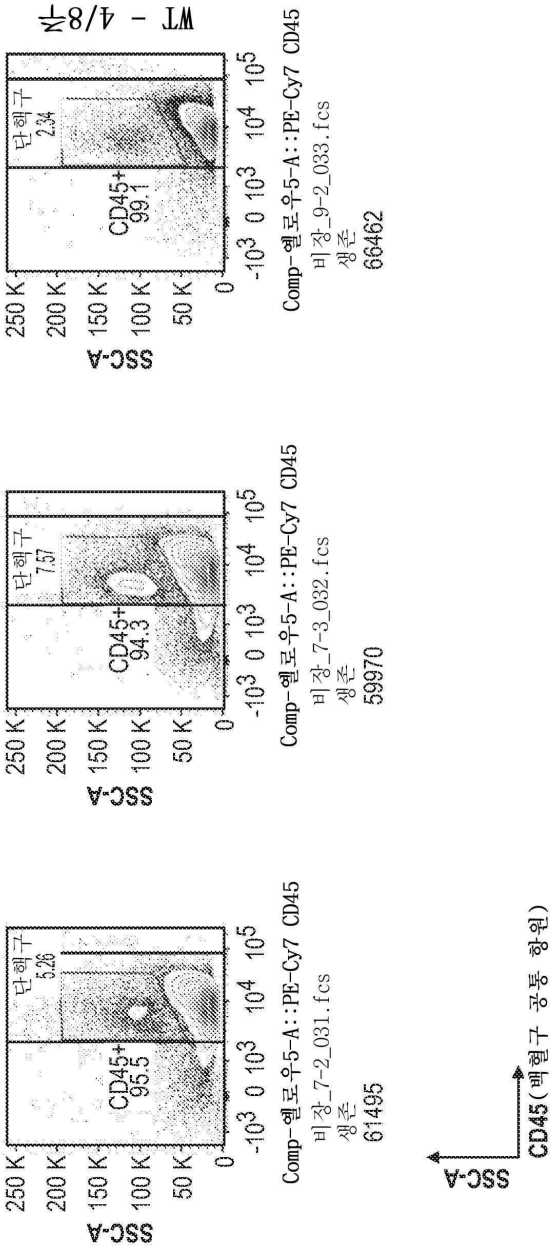
도면5bb


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
0 10^3 10^4 10^5
생존
92.8
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존사멸
혈액_9-2_010.fcs
세포
36658
생존
94.0
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존사멸
혈액_7-3_009.fcs
세포
86709
생존
88.7
Comp-블루4-A::좀비 레드 생존사멸
혈액_7-2_008.fcs
세포
29984
SSC-A
생존/사멸 좀비 레드

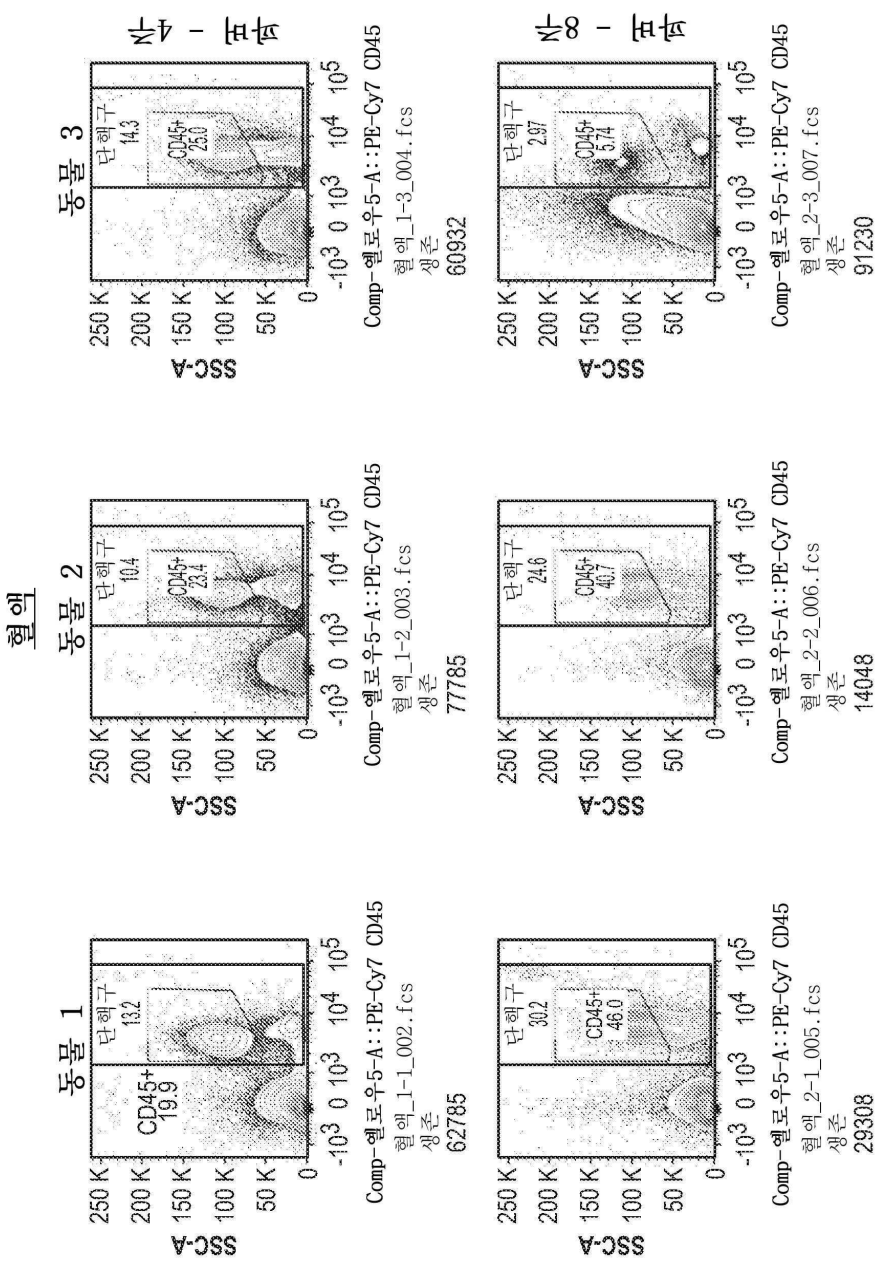
도면6aa


비장
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
단핵구
33.3
CD45+
86.7
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_1-1_025.fcs
생존
45755
단핵구
16.2
CD45+
96.2
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_2-1_028.fcs
생존
61126
단핵구
23.9
CD45+
92.1
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_1-2_026.fcs
생존
43539
단핵구
24.7
CD45+
83.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_2-2_029.fcs
생존
32418
단핵구
24.5
CD45+
94.5
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_1-3_027.fcs
생존
58012
단핵구
25.4
CD45+
89.8
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_2-3_030.fcs
생존
49777

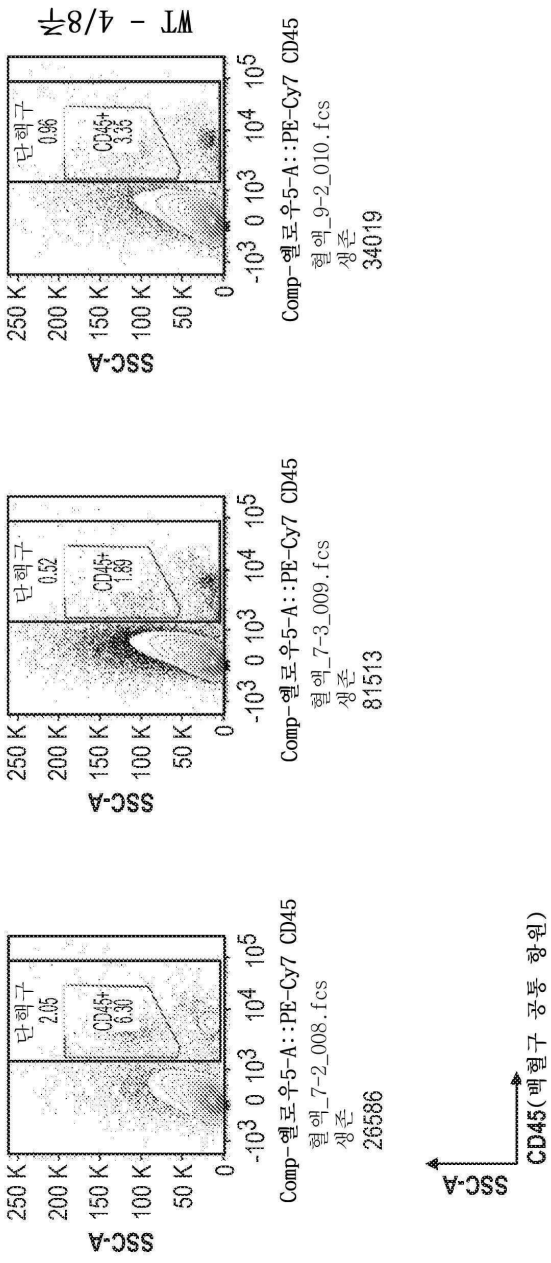
도면6ab


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
CD45+
99.1
단핵구
2.34
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_9-2_033.fcs
생존
66462
CD45+
94.3
단핵구
7.57
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_7-3_032.fcs
생존
59970
CD45+
95.5
단핵구
5.26
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_7-2_031.fcs
생존
61495
CD45(백혈구 공통 항원)

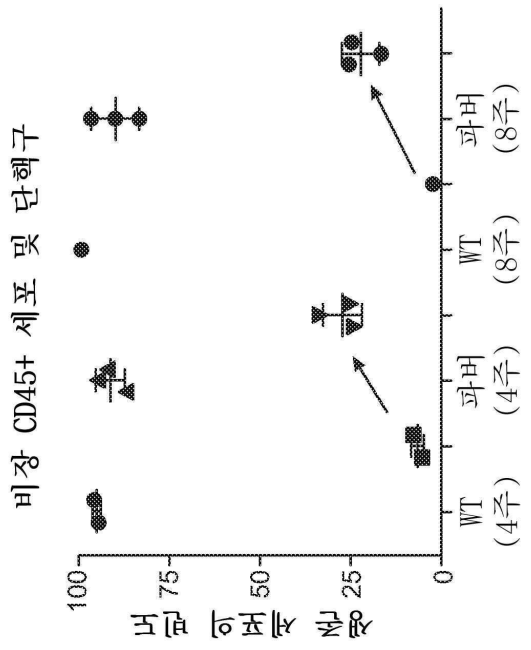
도면6ba


혈액
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
단핵구
13.2
CD45+
19.9
10.4
CD45+
23.4
14.3
CD45+
25.0
30.2
CD45+
46.0
24.6
CD45+
40.7
2.97
CD45+
6.74
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_1-1_002.fcs
생존
62785
혈액_1-2_003.fcs
생존
77785
혈액_1-3_004.fcs
생존
60932
혈액_2-1_005.fcs
생존
29308
혈액_2-2_006.fcs
생존
14048
혈액_2-3_007.fcs
생존
91230

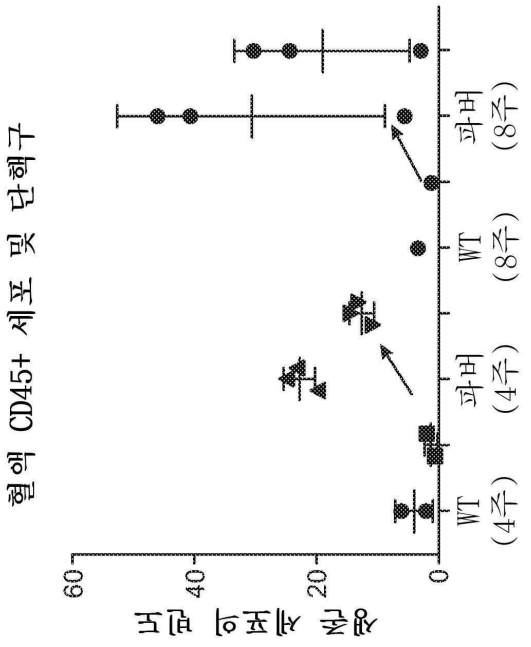
도면6bb


WT - 4/8주
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
단핵구
0.96
CD45+
3.36
Comp-엘로우-5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_9-2_010.fcs
생존
34019
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
단핵구
0.52
CD45+
1.89
Comp-엘로우-5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_7-3_009.fcs
생존
81513
SSC-A
250 K
200 K
150 K
100 K
50 K
0
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
단핵구
2.05
CD45+
6.30
Comp-엘로우-5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_7-2_008.fcs
생존
26586
SSC-A
CD45(백혈구 공통 항원)

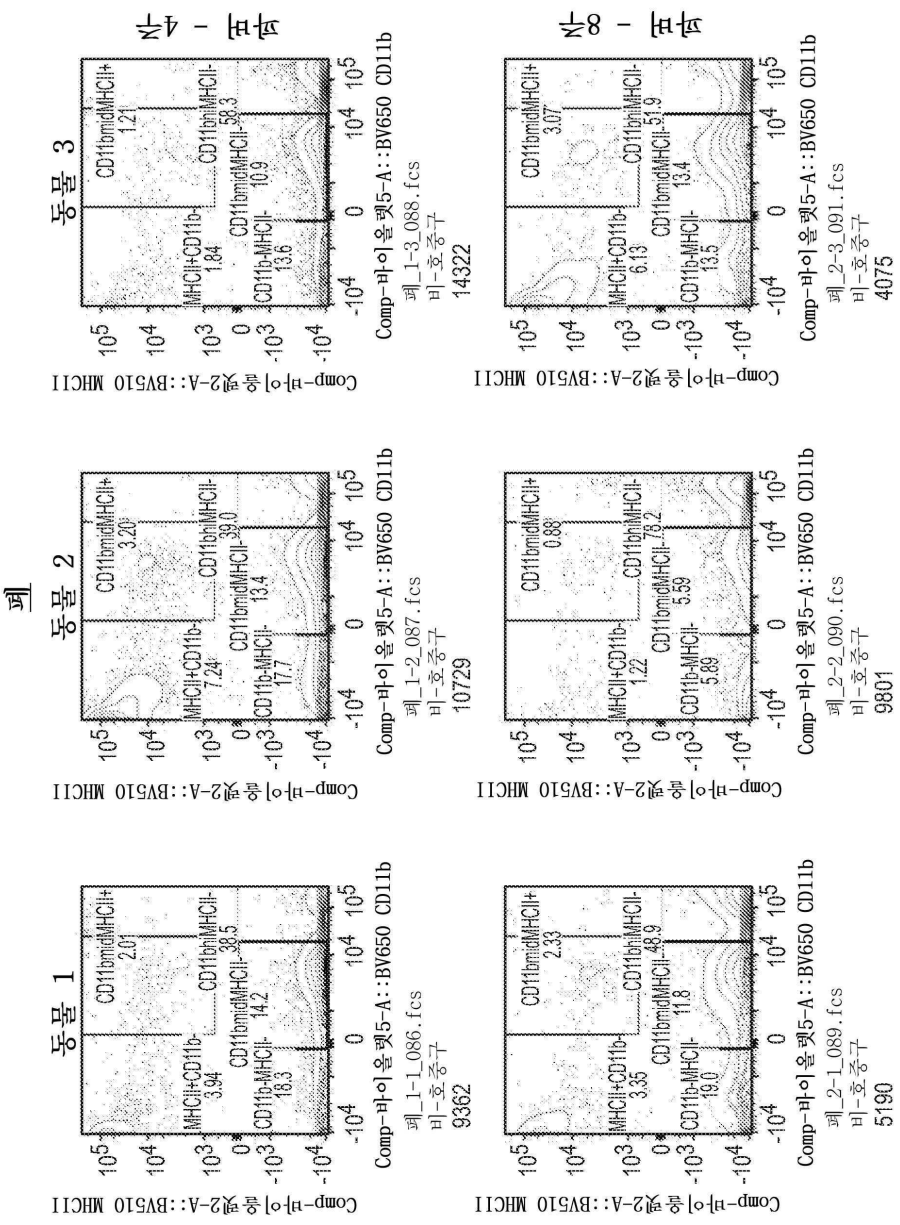
도면7a


비장 CD45+ 세포 및 단핵구
생존 세포의 빈도
100
75
50
25
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)

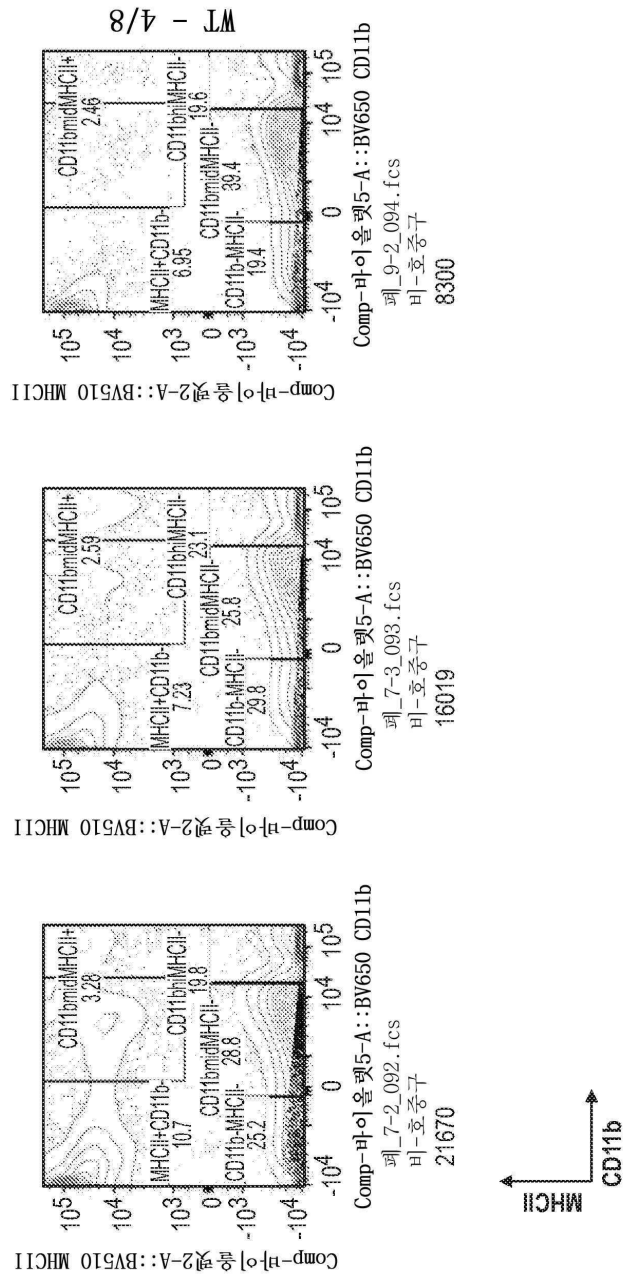
도면7b


혈액 CD45+ 세포 및 단핵구
생존 세포의 빈도
60
40
20
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)

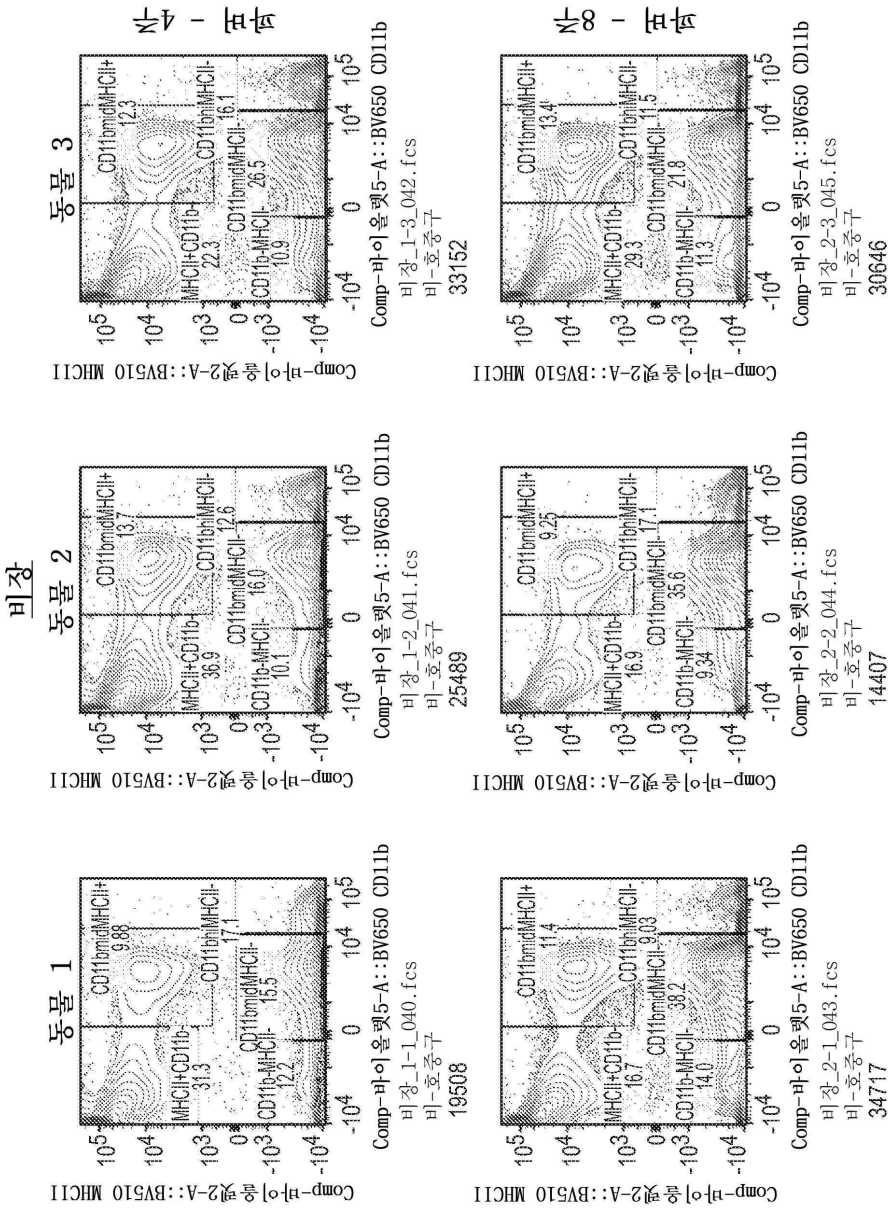
도면8aa


폐
동물 1
동물 2
동물 3
코버 - 8주
코버 - 4주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
MHCII+CD11b-
CD11bmidMHCII-
CD11bhiMHCII-
CD11b-MHCII-
폐_1-1_086.fcs
비-호중구
9362
폐_1-2_087.fcs
비-호중구
10729
폐_1-3_088.fcs
비-호중구
14322
폐_2-1_089.fcs
비-호중구
5190
폐_2-2_090.fcs
비-호중구
9801
폐_2-3_091.fcs
비-호중구
4075

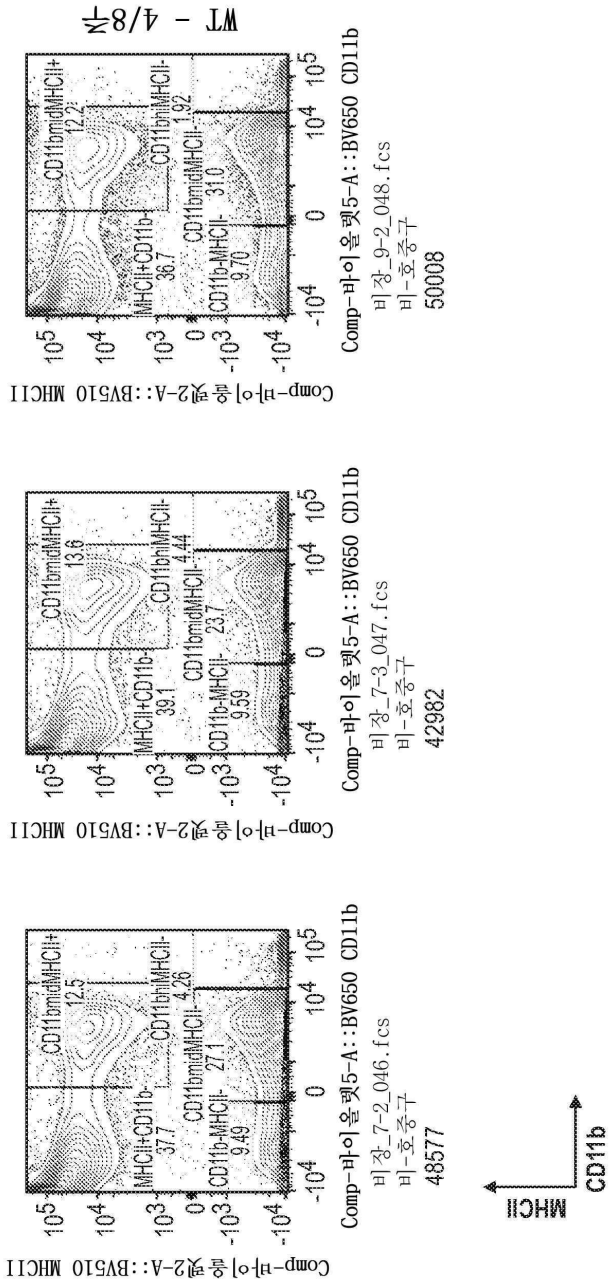
도면8ab


WT - 4/8
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
MHCII+CD11b+ 6.95
CD11bmidMHCII+ 2.46
CD11bhiMHCII- 19.6
CD11b-MHCII- 19.4
CD11bmidMHCII- 39.4
파_9-2_094.fcs
비-호중구
8300
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
MHCII+CD11b+ 7.23
CD11bmidMHCII+ 2.59
CD11bhiMHCII- 23.1
CD11b-MHCII- 29.8
CD11bmidMHCII- 25.8
파_7-3_093.fcs
비-호중구
16019
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
MHCII+CD11b+ 10.7
CD11bmidMHCII+ 3.28
CD11bhiMHCII- 19.8
CD11b-MHCII- 25.2
CD11bmidMHCII- 28.8
파_7-2_092.fcs
비-호중구
21670
MHCII
CD11b

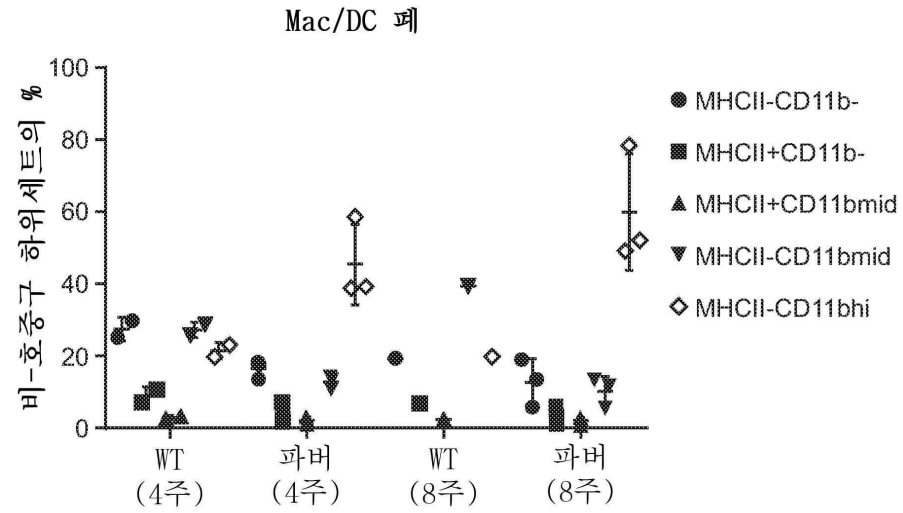
도면8ba


비장
동물 1
동물 2
동물 3
파부 - 4주
파부 - 8주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bmidMHCII+
CD11bhiMHCII+
MHCII+CD11b-
CD11b-MHCII-
비장_1-1_040.fcs
비-호중구
19508
비장_1-2_041.fcs
비-호중구
25489
비장_1-3_042.fcs
비-호중구
33152
비장_2-1_043.fcs
비-호중구
34717
비장_2-2_044.fcs
비-호중구
14407
비장_2-3_045.fcs
비-호중구
30646

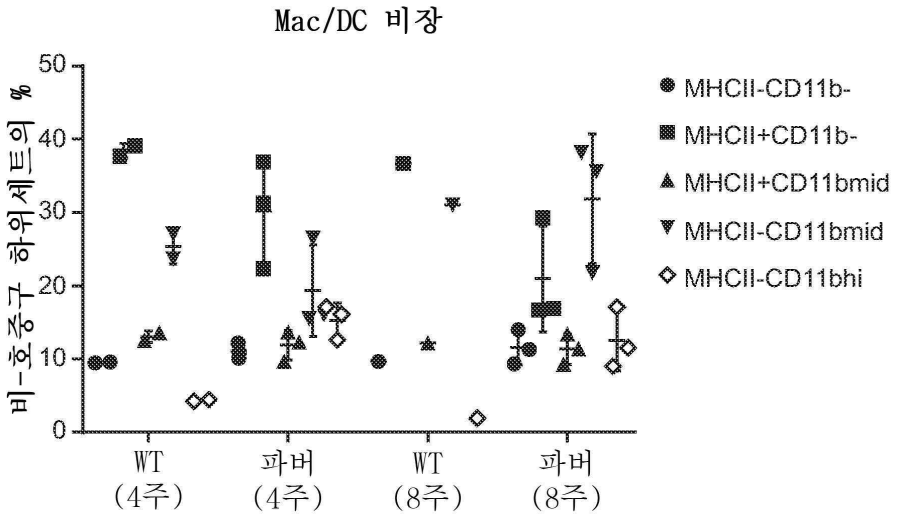
도면8bb


WT - 4/8주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_9-2_048.fcs
비-호중구
50008
CD11bmidMHCII+
12.2
MHCII+CD11b-
36.7
CD11bhiMHCII-
1.92
CD11bmidMHCII-
31.0
CD11b-MHCII-
9.70
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_7-3_047.fcs
비-호중구
42982
CD11bmidMHCII+
13.6
MHCII+CD11b-
39.1
CD11bhiMHCII-
4.44
CD11bmidMHCII-
23.7
CD11b-MHCII-
9.59
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_7-2_046.fcs
비-호중구
48577
CD11bmidMHCII+
12.5
MHCII+CD11b-
37.7
CD11bhiMHCII-
4.26
CD11bmidMHCII-
27.1
CD11b-MHCII-
9.49
MHCII
CD11b

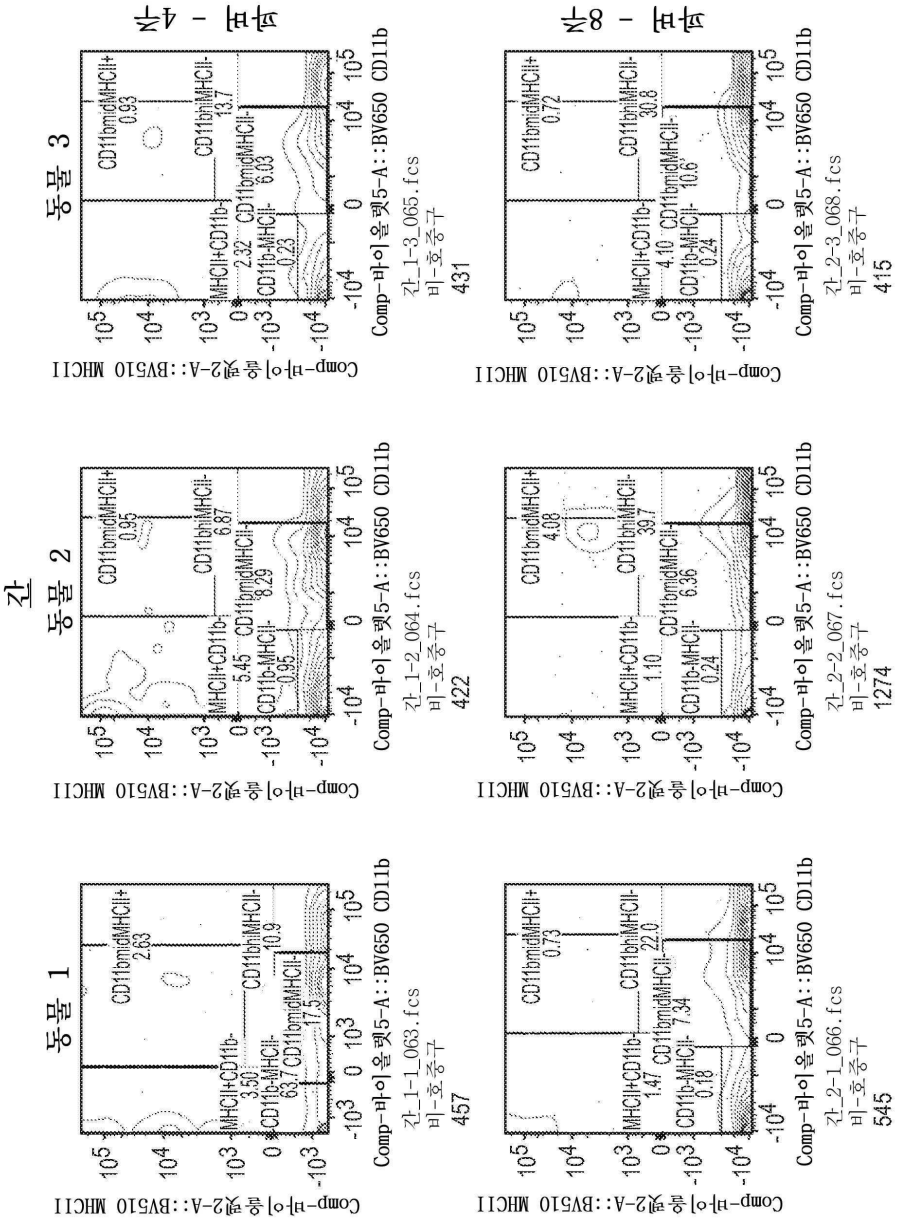
도면9a


Mac/DC 폐
비-호중구 하위세트의 %
100
80
60
40
20
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11bmid
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhi

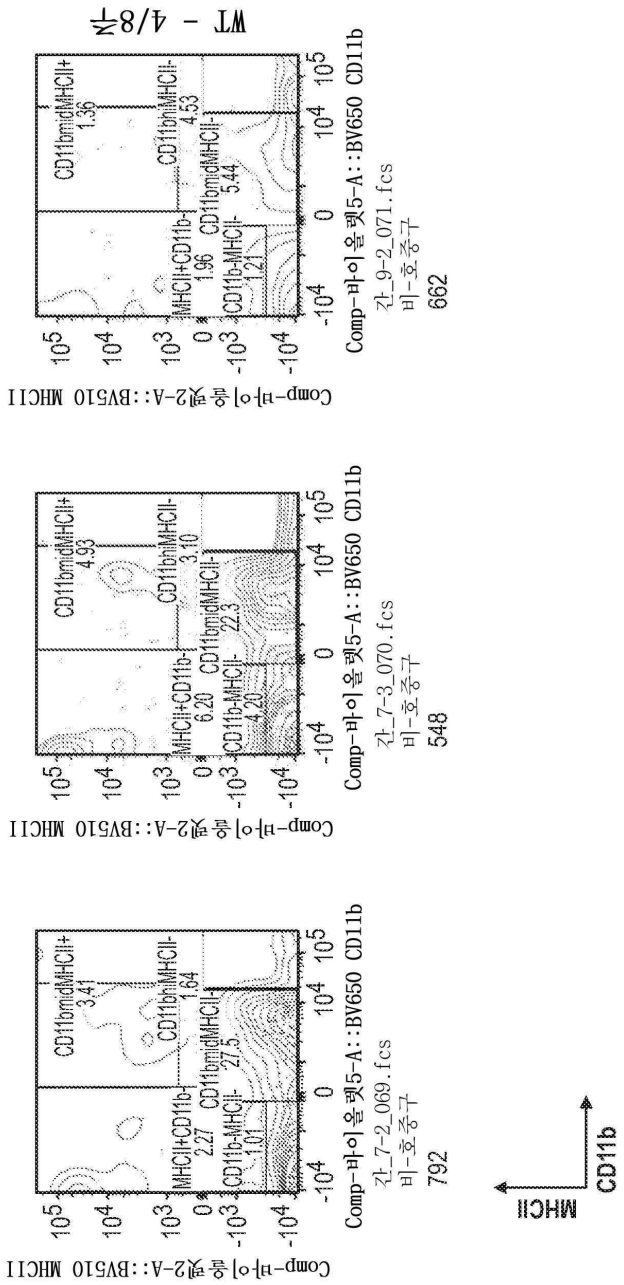
도면9b


Mac/DC 비장
비-호중구 하위세트의 %
50
40
30
20
10
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11bmid
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhi

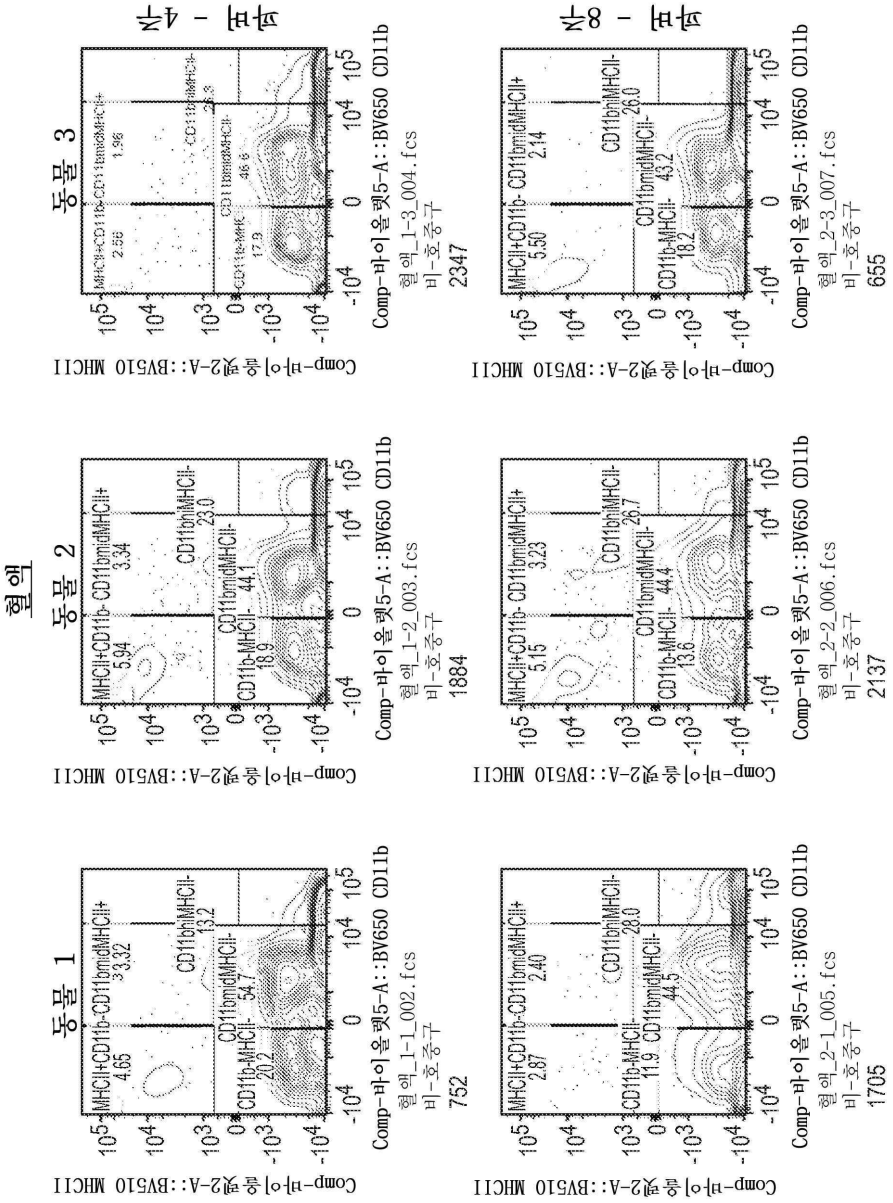
도면10aa


간
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 8주
파버 - 4주
CD11bmidMHCII+
CD11bhiMHCII-
MHCII+CD11b-
CD11b-MHCII-
CD11bmidMHCII+
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
간_1-1_063.fcs
비-호중구
457
간_1-2_064.fcs
비-호중구
422
간_1-3_065.fcs
비-호중구
431
간_2-1_066.fcs
비-호중구
545
간_2-2_067.fcs
비-호중구
1274
간_2-3_068.fcs
비-호중구
415

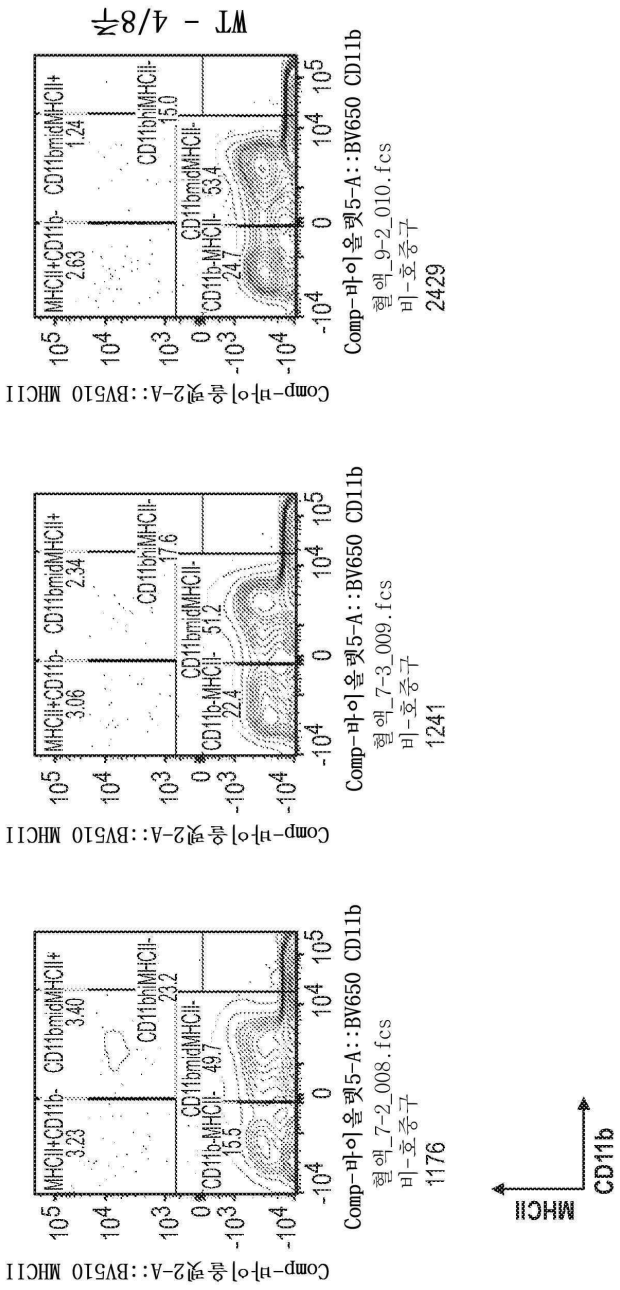
도면10ab


WT - 4/8주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
간_9-2_071.fcs
비-호중구
662
CD11bmidMHCII+ 1.36
CD11bhiMHCII+ 4.53
MHCII+CD11b- 1.96
CD11bmidMHCII- 5.44
CD11b-MHCII- 1.21
간_7-3_070.fcs
548
CD11bmidMHCII+ 4.93
CD11bhiMHCII+ 3.10
MHCII+CD11b- 6.20
CD11bmidMHCII- 22.3
CD11b-MHCII- 4.20
간_7-2_069.fcs
792
CD11bmidMHCII+ 3.41
CD11bhiMHCII+ 1.64
MHCII+CD11b- 2.27
CD11bmidMHCII- 27.5
CD11b-MHCII- 1.01
MHCII
CD11b

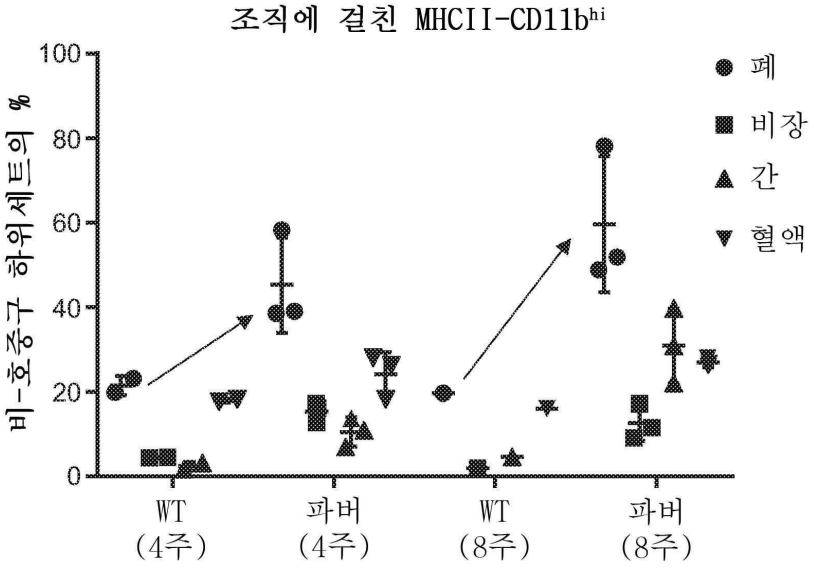
도면10ba


혈액
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 8주
파버 - 4주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
혈액_1-1_002.fcs
혈액_1-2_003.fcs
혈액_1-3_004.fcs
혈액_2-1_005.fcs
혈액_2-2_006.fcs
혈액_2-3_007.fcs
비-호중구
752
1884
2347
1705
2137
655

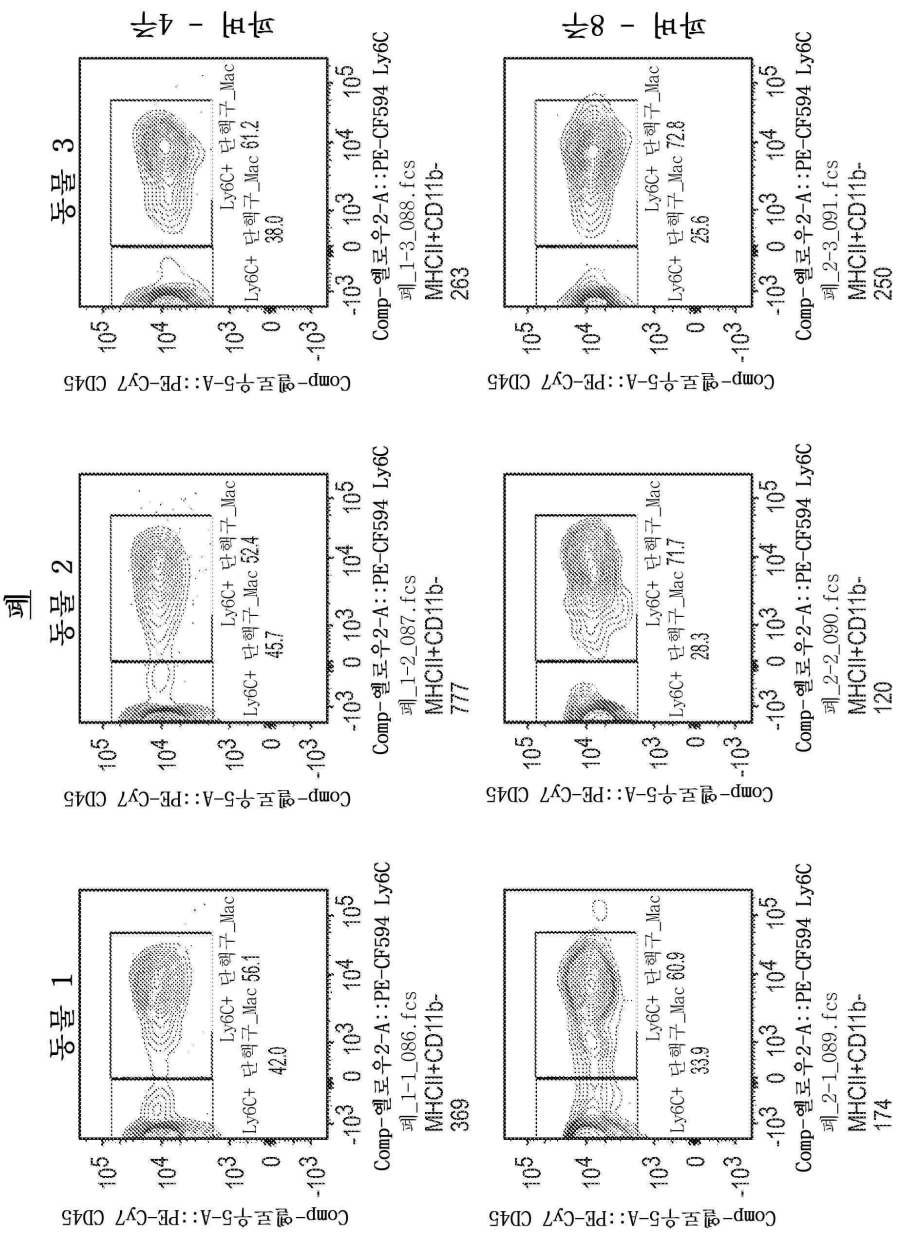
도면10bb


WT - 4/8주
MHCII
CD11b
MHCII+CD11b- 3.23
CD11bmidMHCII+ 3.40
CD11b-MHCII- 15.5
CD11bmidMHCII- 49.7
CD11bhiMHCII- 23.2
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
혈액_7-2_008.fcs
비-호중구
1176
MHCII+CD11b- 3.06
CD11bmidMHCII+ 2.34
CD11b-MHCII- 22.4
CD11bmidMHCII- 51.2
CD11bhiMHCII- 17.6
혈액_7-3_009.fcs
1241
MHCII+CD11b- 2.63
CD11bmidMHCII+ 1.24
CD11b-MHCII- 24.7
CD11bmidMHCII- 53.4
CD11bhiMHCII- 15.0
혈액_9-2_010.fcs
2429

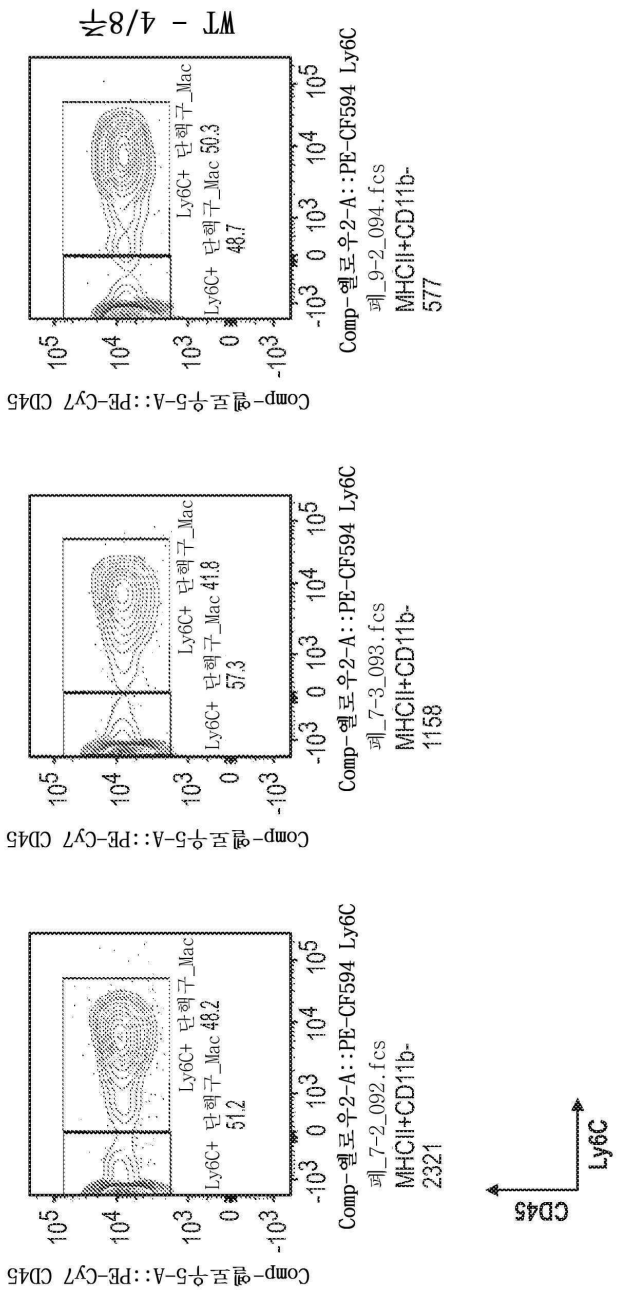
도면11


조직에 걸친 MHCII-CD11b^hi
비-호중구 하위세트의 %
100
80
60
40
20
0
폐
비장
간
혈액
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

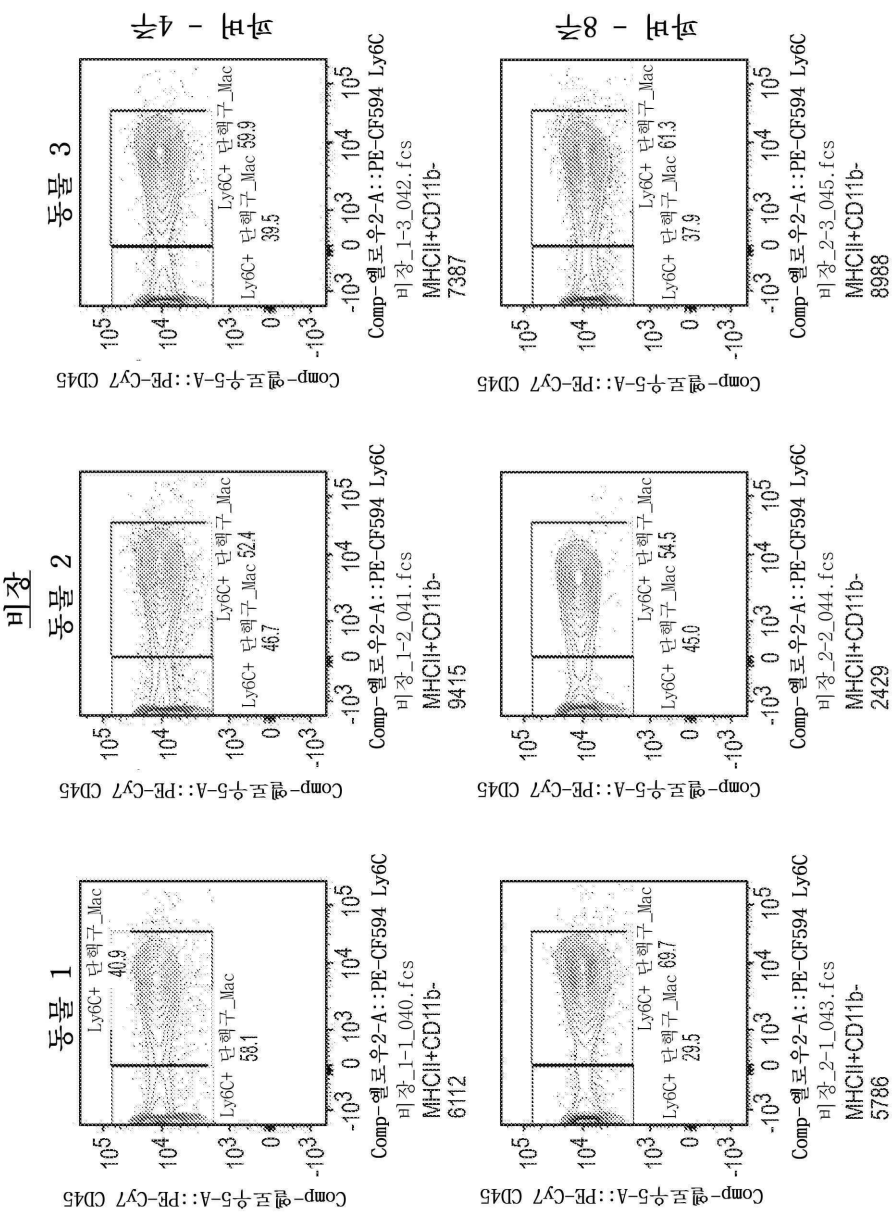
도면12aa


폐
동물 1
동물 2
동물 3
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
Ly6C+ 단핵구_Mac
Ly6C+ 단핵구_Mac 56.1
42.0
폐_1-1_086.fcs
MHCII+CD11b-
369
Ly6C+ 단핵구_Mac 52.4
45.7
폐_1-2_087.fcs
777
Ly6C+ 단핵구_Mac 61.2
38.0
폐_1-3_088.fcs
263
Ly6C+ 단핵구_Mac 71.7
28.3
폐_2-2_090.fcs
120
Ly6C+ 단핵구_Mac 72.8
25.6
폐_2-3_091.fcs
250
Ly6C+ 단핵구_Mac 60.9
33.9
폐_2-1_089.fcs
174
파버 - 4주
파버 - 8주

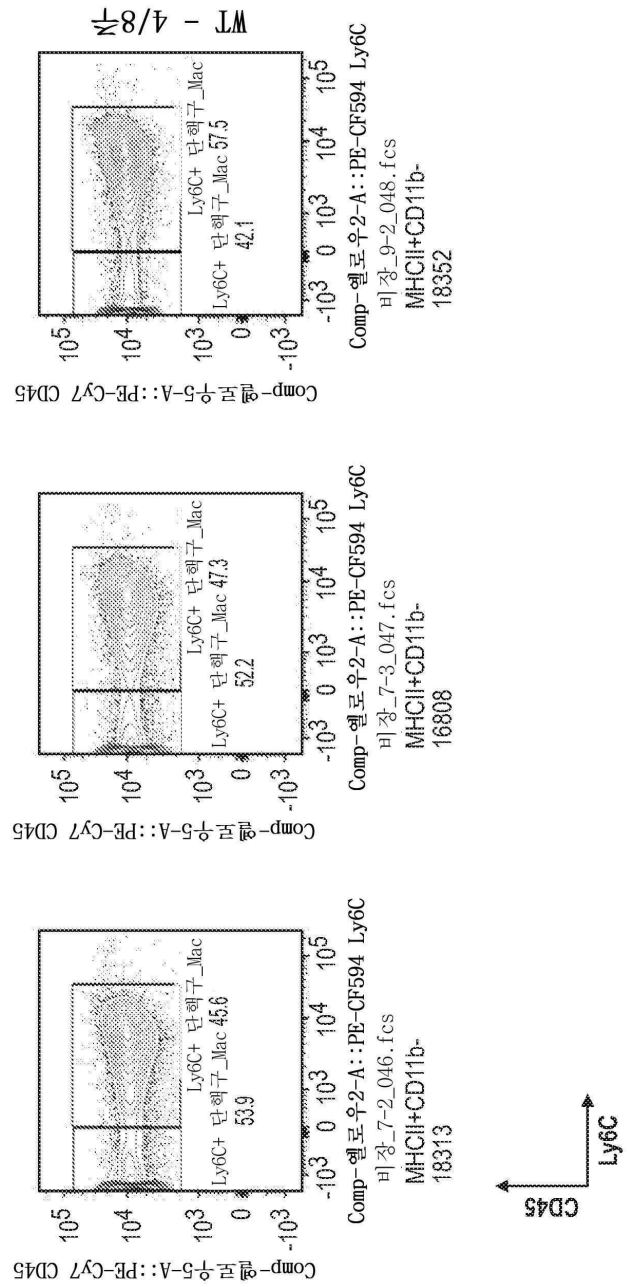
도면12ab


WT - 4/8주
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
파_9-2_094.fcs
MHCII+CD11b-
577
Ly6C+ 단핵구_Mac
Ly6C+ 단핵구_Mac 50.3
48.7
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
파_7-3_093.fcs
MHCII+CD11b-
1158
Ly6C+ 단핵구_Mac
Ly6C+ 단핵구_Mac 41.8
57.3
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
파_7-2_092.fcs
MHCII+CD11b-
2321
Ly6C+ 단핵구_Mac
Ly6C+ 단핵구_Mac 48.2
51.2
CD45
Ly6C

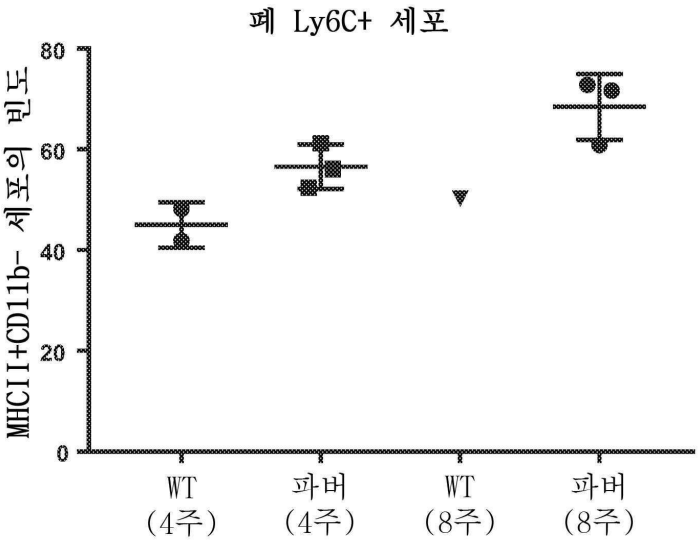
도면12ba


비장
동물 1
동물 2
동물 3
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-헬로우2-A::PE-CF594 Ly6C
Ly6C+ 단핵구_Mac
Ly6C+ 단핵구_Mac 58.1
Ly6C+ 단핵구_Mac 40.9
Ly6C+ 단핵구_Mac 46.7
Ly6C+ 단핵구_Mac 52.4
Ly6C+ 단핵구_Mac 39.5
Ly6C+ 단핵구_Mac 59.9
비장_1-1_040.fcs
비장_1-2_041.fcs
비장_1-3_042.fcs
MHCII+CD11b-
6112
9415
7387
Ly6C+ 단핵구_Mac 29.5
Ly6C+ 단핵구_Mac 69.7
Ly6C+ 단핵구_Mac 45.0
Ly6C+ 단핵구_Mac 54.5
Ly6C+ 단핵구_Mac 37.9
Ly6C+ 단핵구_Mac 61.3
비장_2-1_043.fcs
비장_2-2_044.fcs
비장_2-3_045.fcs
5786
2429
8988
과버 - 4주
과버 - 8주

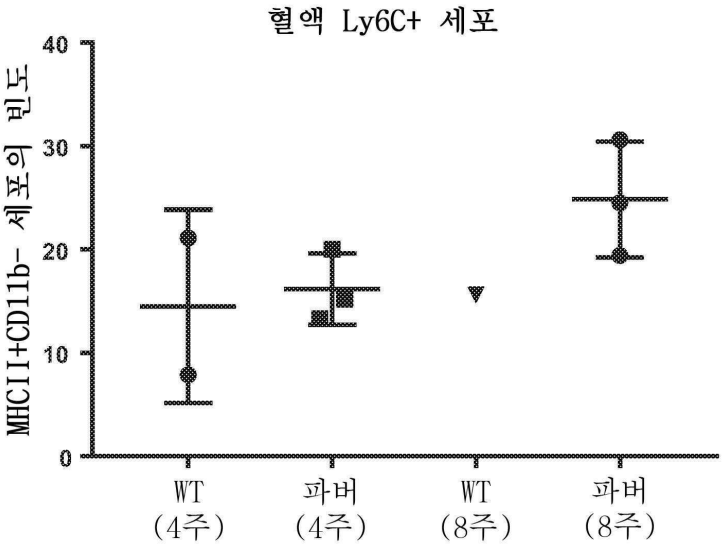
도면12bb


WT - 4/8주
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
비장_9-2_048.fcs
MHCII+CD11b-
18352
Ly6C+ 단핵구_Mac 57.5
Ly6C+ 단핵구_Mac
42.1
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
비장_7-3_047.fcs
MHCII+CD11b-
16808
Ly6C+ 단핵구_Mac 47.3
Ly6C+ 단핵구_Mac
52.2
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-엘로우2-A::PE-CF594 Ly6C
비장_7-2_046.fcs
MHCII+CD11b-
18313
Ly6C+ 단핵구_Mac 45.6
Ly6C+ 단핵구_Mac
53.9
CD45
Ly6C

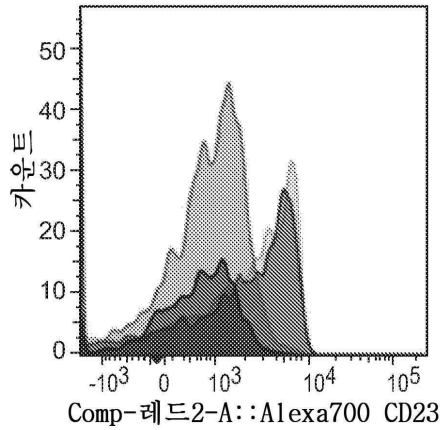
도면13a


폐 Ly6C+ 세포
MHCII+CD11b- 세포의 빈도
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

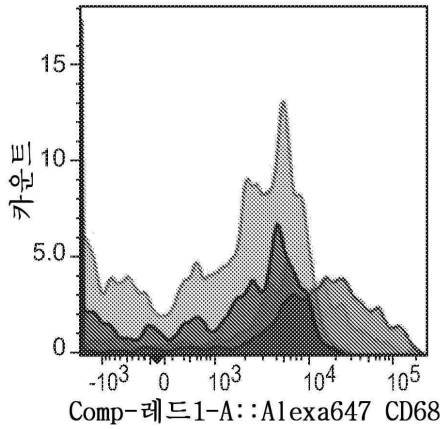
도면13b


혈액 Ly6C+ 세포
MHCII+CD11b- 세포의 빈도
40
30
20
10
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

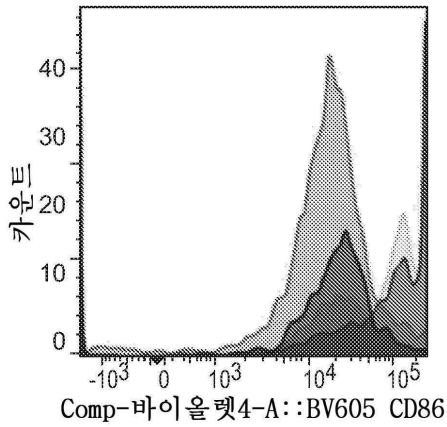
도면14a



	시료 명칭	하위세트 명칭
	폐_9-2_094.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_7-2_092.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_2-2_090.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_1-3_088.fcs	CD11b+MHCII-

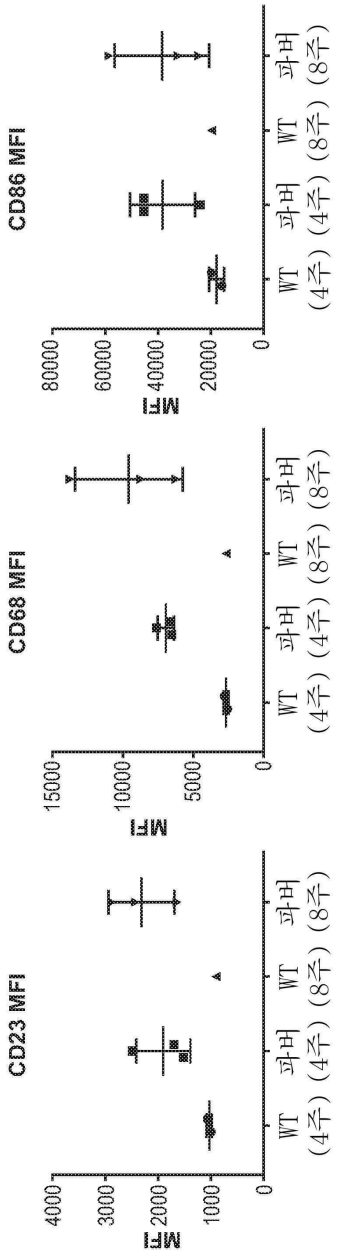


	시료 명칭	하위세트 명칭
	폐_9-2_094.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_7-2_092.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_2-3_091.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_1-3_088.fcs	CD11b+MHCII-

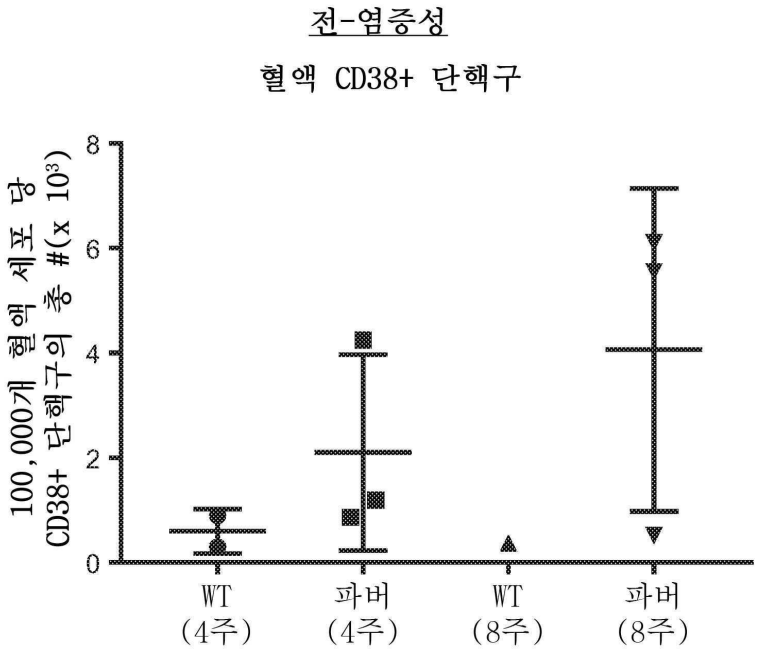


	시료 명칭	하위세트 명칭
	폐_9-2_094.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_7-2_092.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_2-3_091.fcs	CD11b+MHCII-
	폐_1-2_087.fcs	CD11b+MHCII-

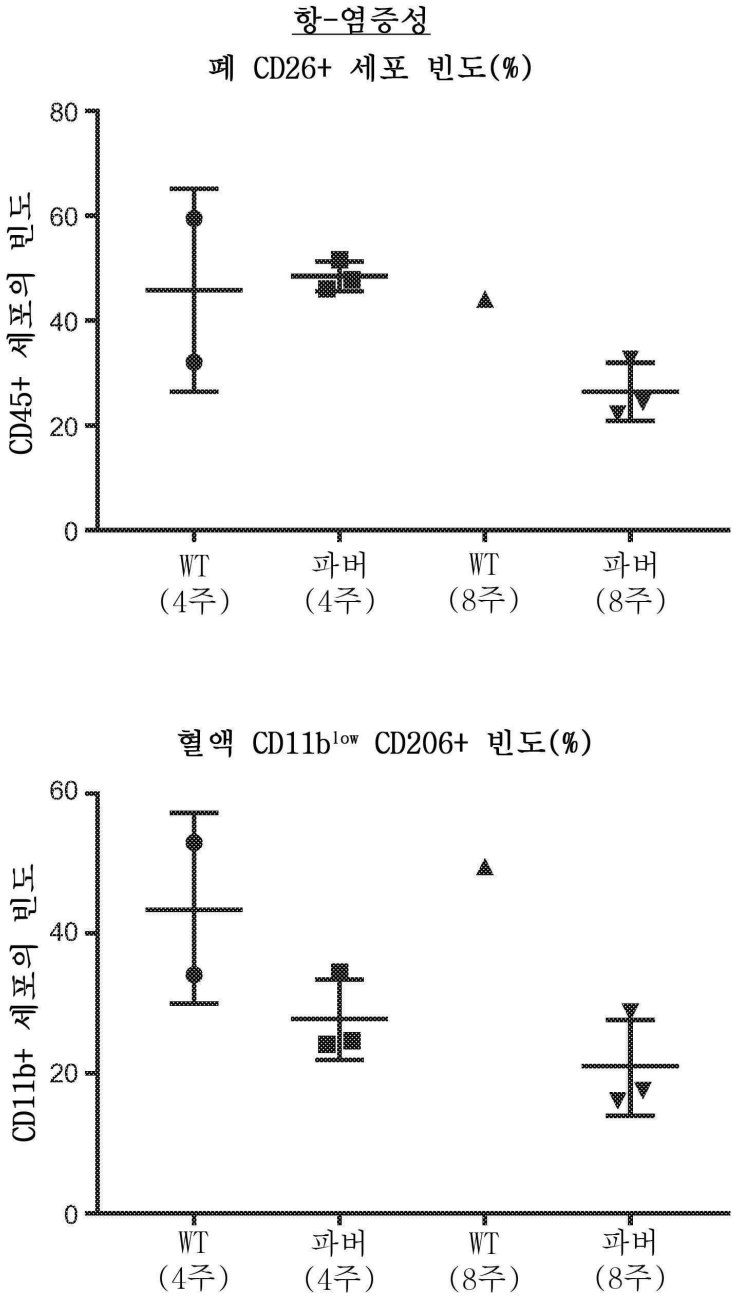
도면14b


CD23 MFI
CD68 MFI
CD86 MFI
MFI
4000
3000
2000
1000
0
15000
10000
5000
80000
60000
40000
20000
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)

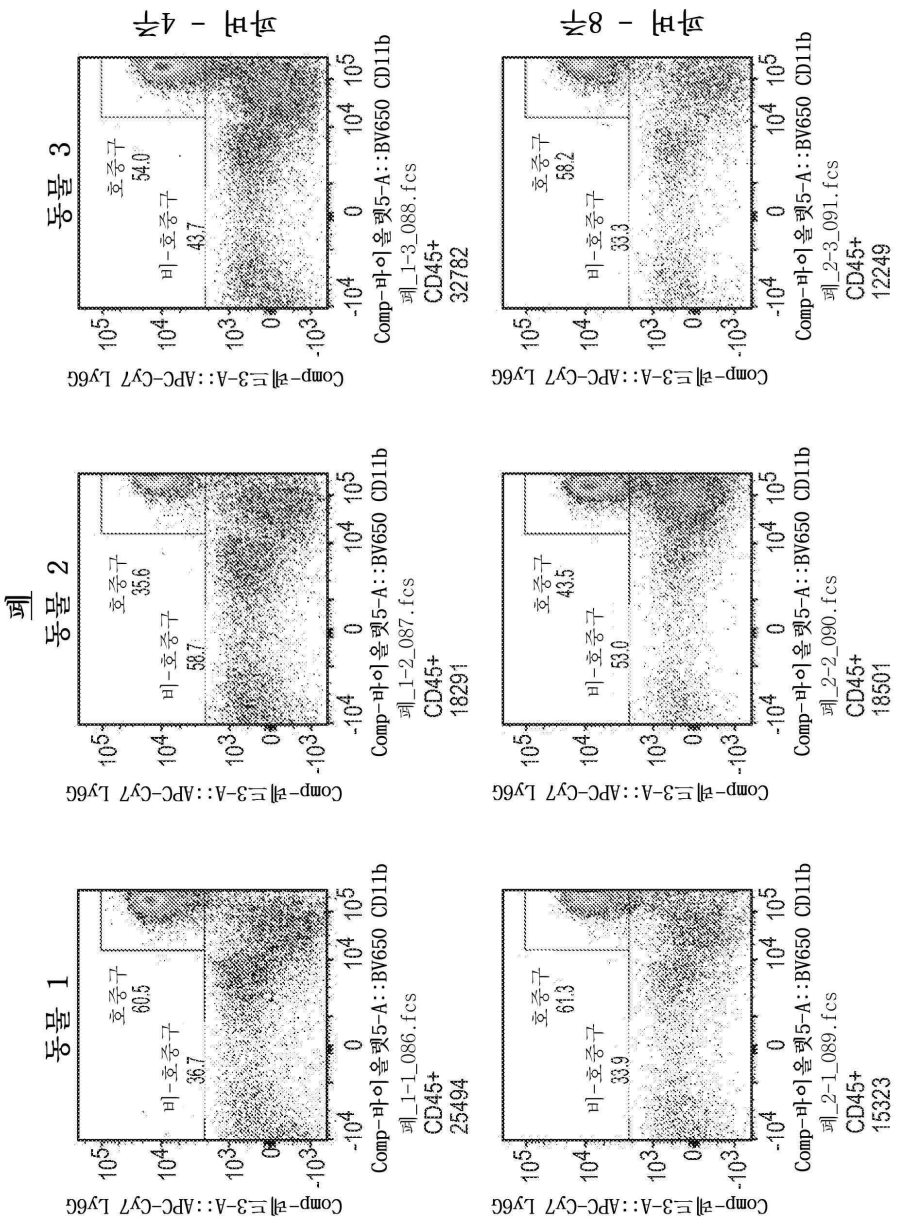
도면15a


전-염증성
혈액 CD38+ 단핵구
100,000개 혈액 세포 당
CD38+ 단핵구의 총 #(x 10³)
8
6
4
2
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

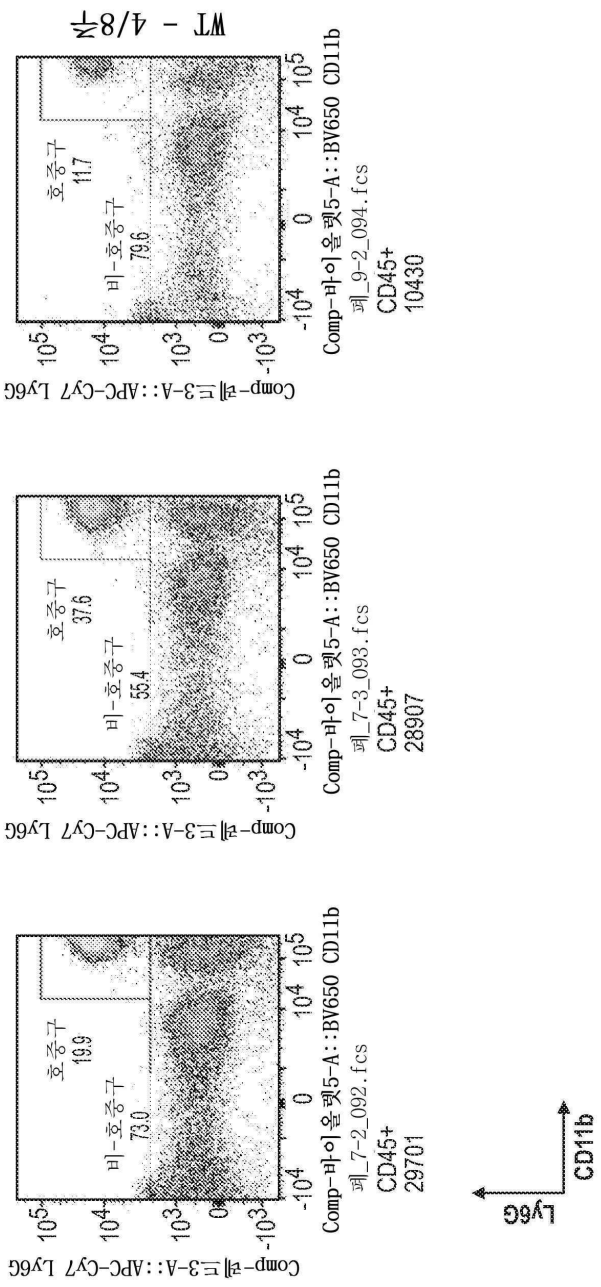
도면15b


항-염증성
폐 CD26+ 세포 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)
혈액 CD11b low CD206+ 빈도(%)
CD11b+ 세포의 빈도
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

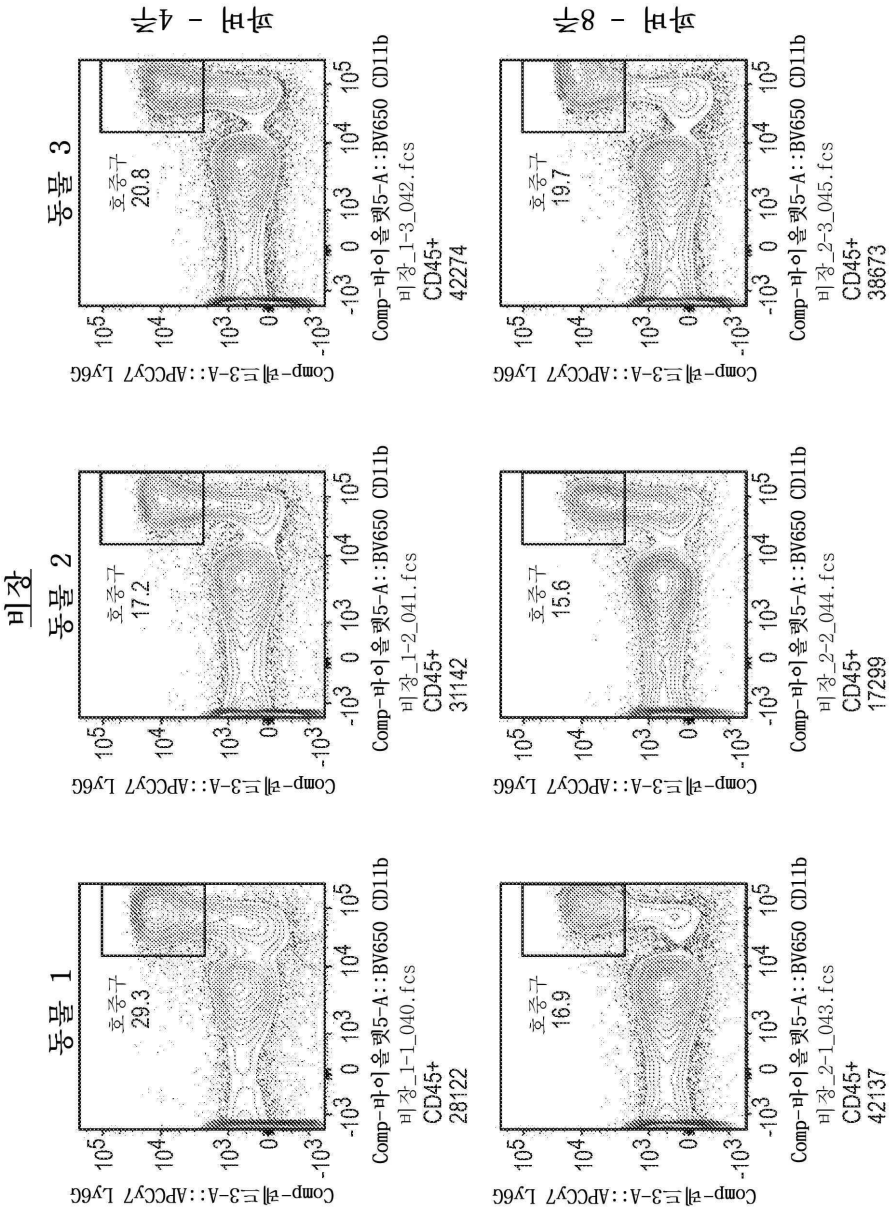
도면16a


폐
동물 1
동물 2
동물 3
코버 - 8주
코버 - 4주
호중구
비-호중구
60.5
36.7
35.6
58.7
43.5
53.0
61.3
33.9
54.0
43.7
58.2
33.3
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
폐_1-1_086.fcs
폐_1-2_087.fcs
폐_1-3_088.fcs
폐_2-2_090.fcs
폐_2-1_089.fcs
폐_2-3_091.fcs
CD45+
25494
18291
32782
18501
15323
12249

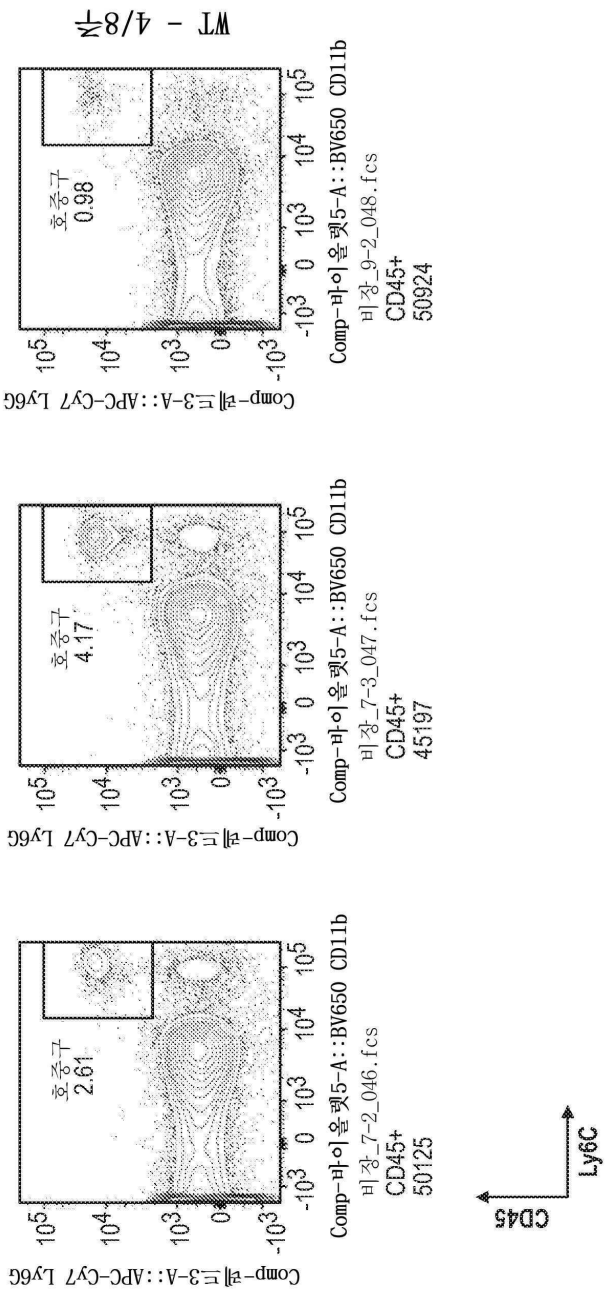
도면16b


WT - 4/8주
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
파_9-2_094.fcs
CD45+
10430
호중구
11.7
비-호중구
79.6
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
파_7-3_093.fcs
CD45+
28907
호중구
37.6
비-호중구
55.4
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
파_7-2_092.fcs
CD45+
29701
호중구
19.9
비-호중구
73.0
Ly6G
CD11b

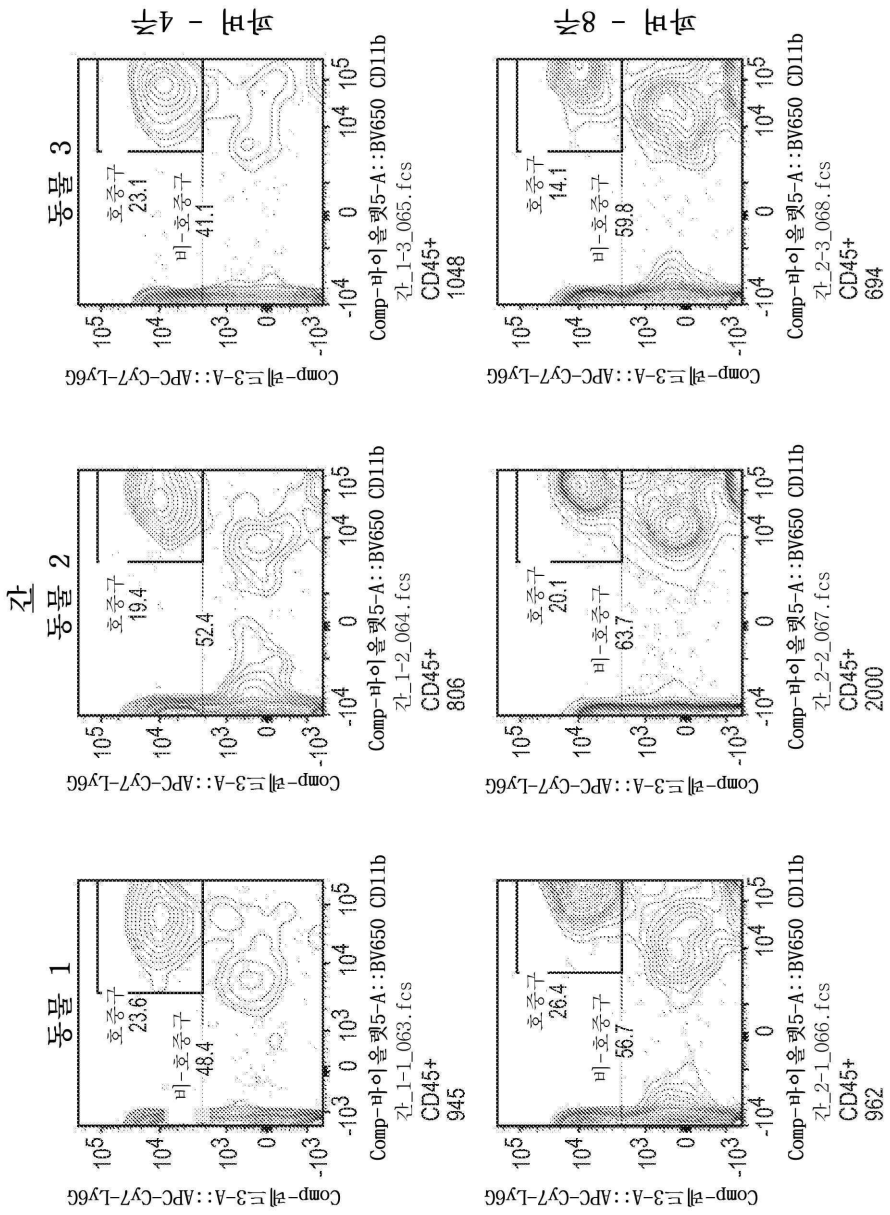
도면17a


비장
동물 1
동물 2
동물 3
8주
4주
호중구
29.3
17.2
20.8
16.9
15.6
19.7
CD45+
28122
31142
42274
42137
17299
38673
비장_1-1_040.fcs
비장_1-2_041.fcs
비장_1-3_042.fcs
비장_2-1_043.fcs
비장_2-2_044.fcs
비장_2-3_045.fcs
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
Comp-레드3-A::APCCy7 Ly6G

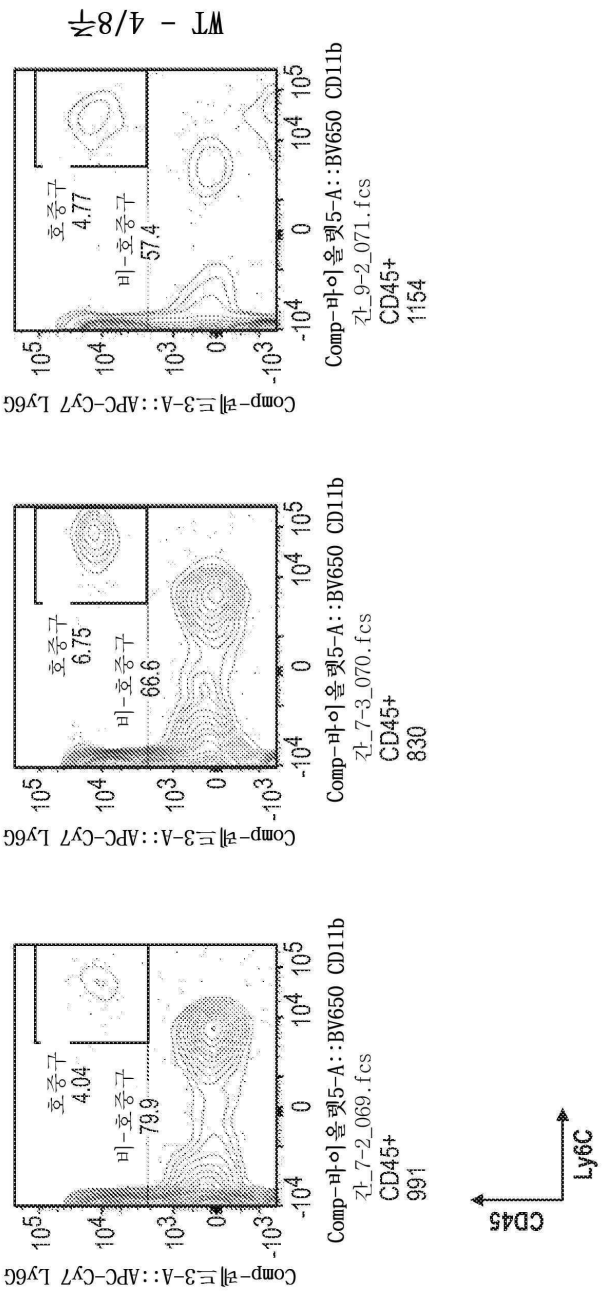
도면17b


WT - 4/8주
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_9-2_048.fcs
CD45+
50924
호중구
0.98
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_7-3_047.fcs
CD45+
45197
호중구
4.17
Comp-퍼킨엘름3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
비장_7-2_046.fcs
CD45+
50125
호중구
2.61
CD45
Ly6C

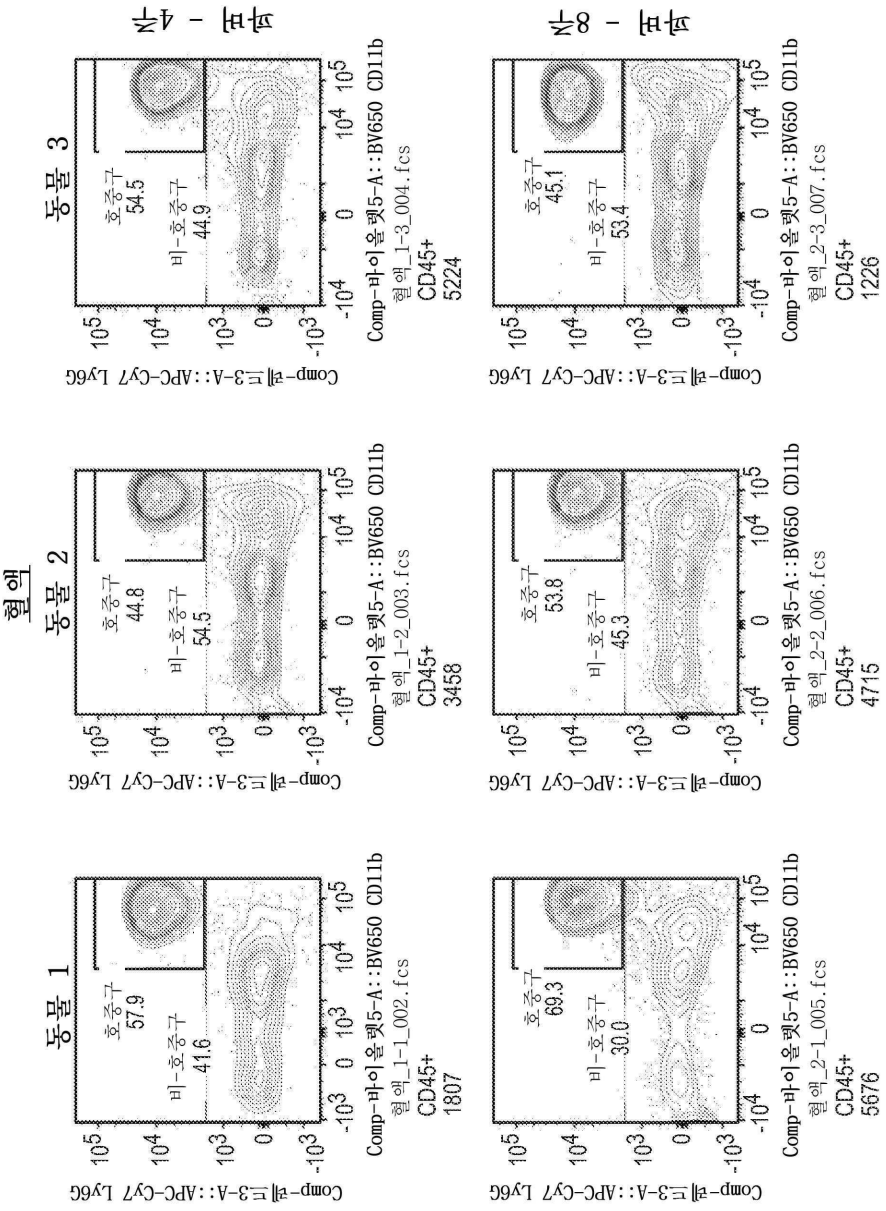
도면18a


간
동물 1
동물 2
동물 3
폐부 - 4주
폐부 - 8주
호중구
23.6
비-호중구
48.4
호중구
19.4
52.4
호중구
23.1
비-호중구
41.1
호중구
26.4
비-호중구
56.7
호중구
20.1
비-호중구
63.7
호중구
14.1
비-호중구
59.8
Comp-셀 드3-A::APC-Cy7-Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
간_1-1_063.fcs
CD45+
945
간_1-2_064.fcs
CD45+
806
간_1-3_065.fcs
CD45+
1048
간_2-1_066.fcs
CD45+
962
간_2-2_067.fcs
CD45+
2000
간_2-3_068.fcs
CD45+
694

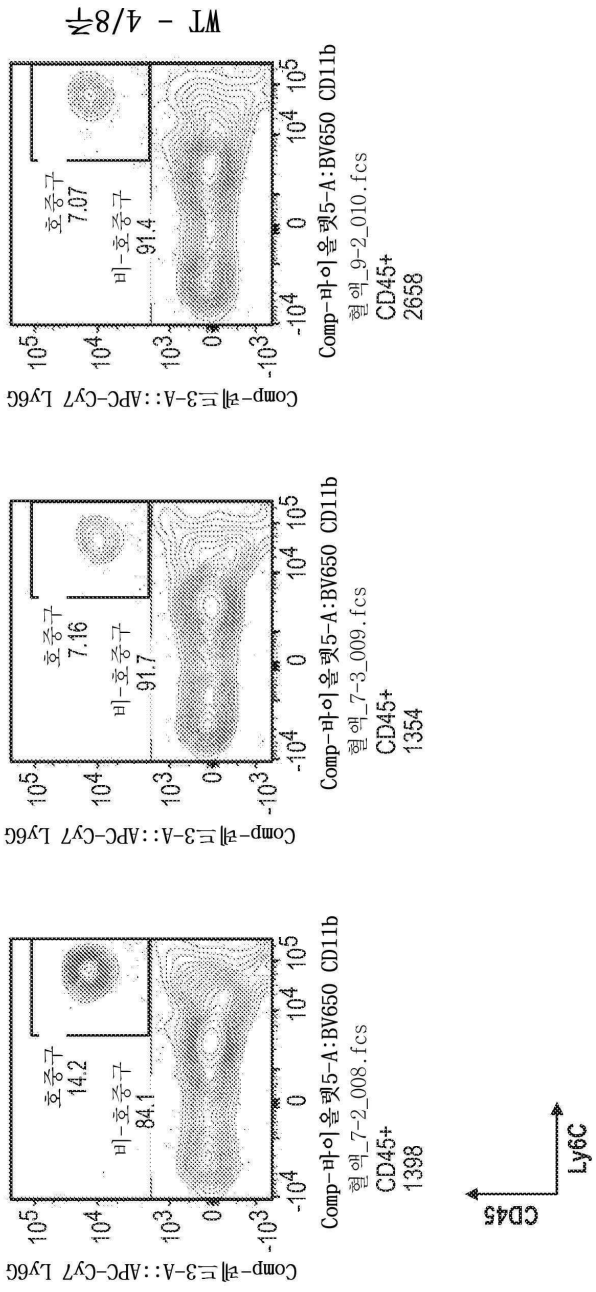
도면18b


WT - 4/8주
Comp-퍼 E3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
간_9-2_071.fcs
CD45+
1154
호중구
4.77
비-호중구
57.4
간_7-3_070.fcs
CD45+
830
호중구
6.75
비-호중구
66.6
간_7-2_069.fcs
CD45+
991
호중구
4.04
비-호중구
79.9
CD45
Ly6C

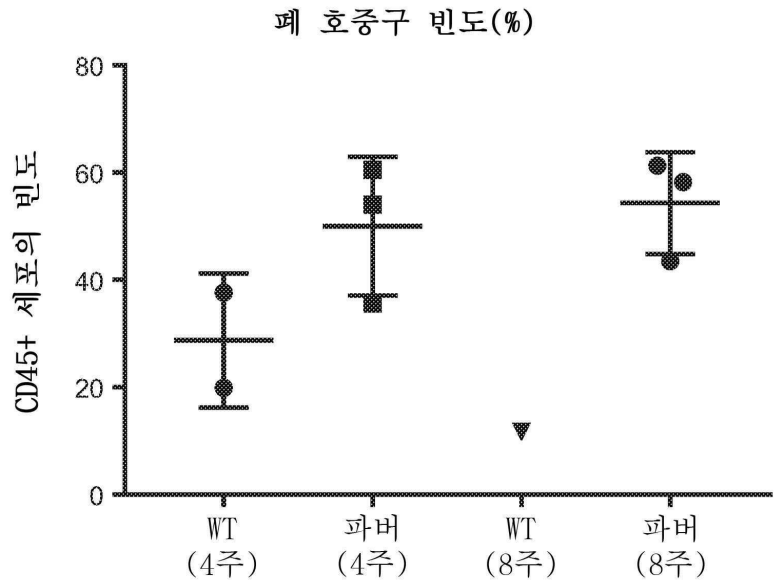
도면19a


혈액
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 8주
파버 - 4주
호중구
57.9
비-호중구
41.6
호중구
44.8
비-호중구
54.5
호중구
54.5
비-호중구
44.9
호중구
53.8
비-호중구
45.3
호중구
45.1
비-호중구
53.4
호중구
69.3
비-호중구
30.0
Comp-퍼킨_E3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
혈액_1-1_002.fcs
CD45+
1807
혈액_1-2_003.fcs
CD45+
3458
혈액_1-3_004.fcs
CD45+
5224
혈액_2-1_005.fcs
CD45+
5676
혈액_2-2_006.fcs
CD45+
4715
혈액_2-3_007.fcs
CD45+
1226

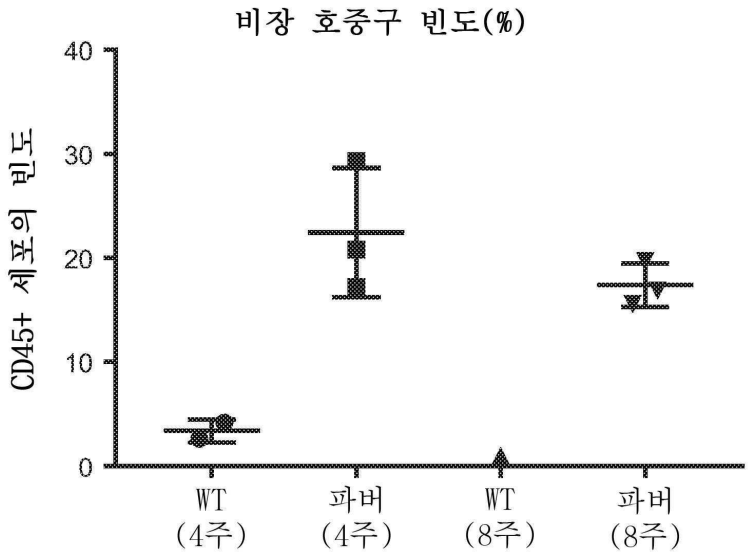
도면19b


WT - 4/8주
Comp-퍼 ㄷ3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A:BV650 CD11b
혈액_9-2_010.fcs
CD45+
2658
비-호중구
91.4
호중구
7.07
Comp-퍼 ㄷ3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A:BV650 CD11b
혈액_7-3_009.fcs
CD45+
1354
비-호중구
91.7
호중구
7.16
Comp-퍼 ㄷ3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A:BV650 CD11b
혈액_7-2_008.fcs
CD45+
1398
비-호중구
84.1
호중구
14.2
CD45
Ly6C

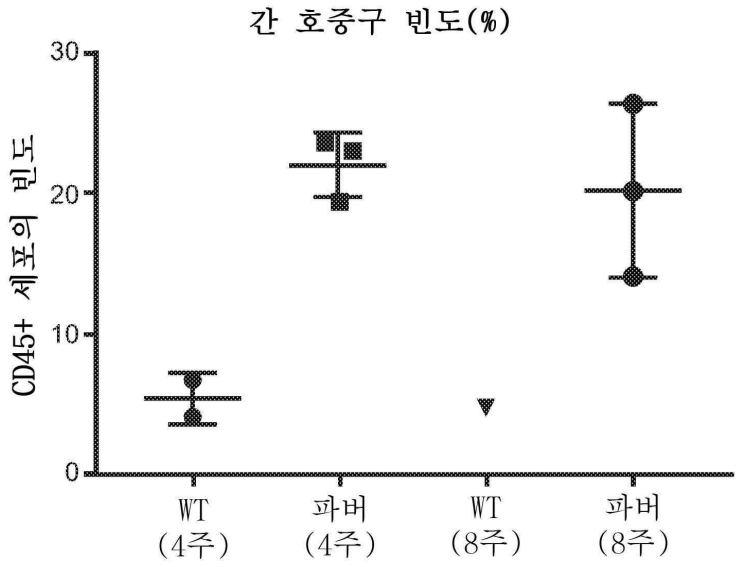
도면20a


폐 호중구 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

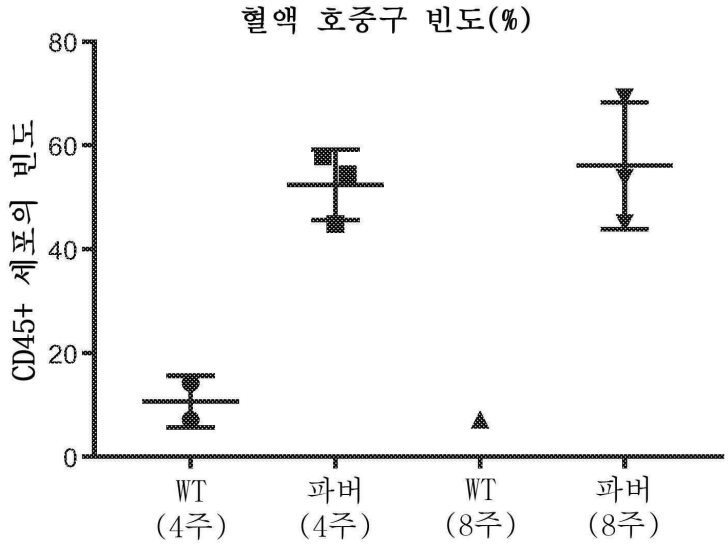
도면20b


비장 호중구 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
40
30
20
10
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

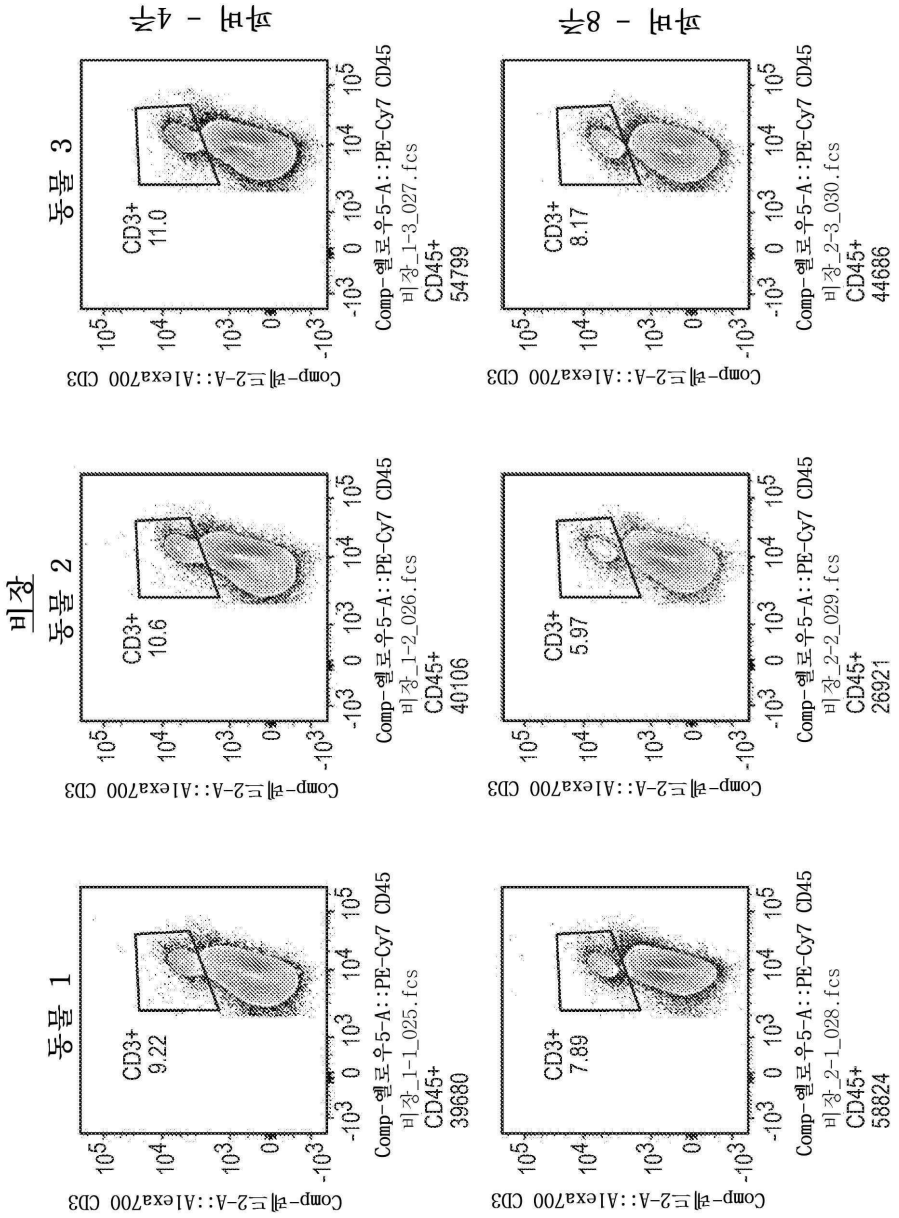
도면20c


간 호중구 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
30
20
10
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

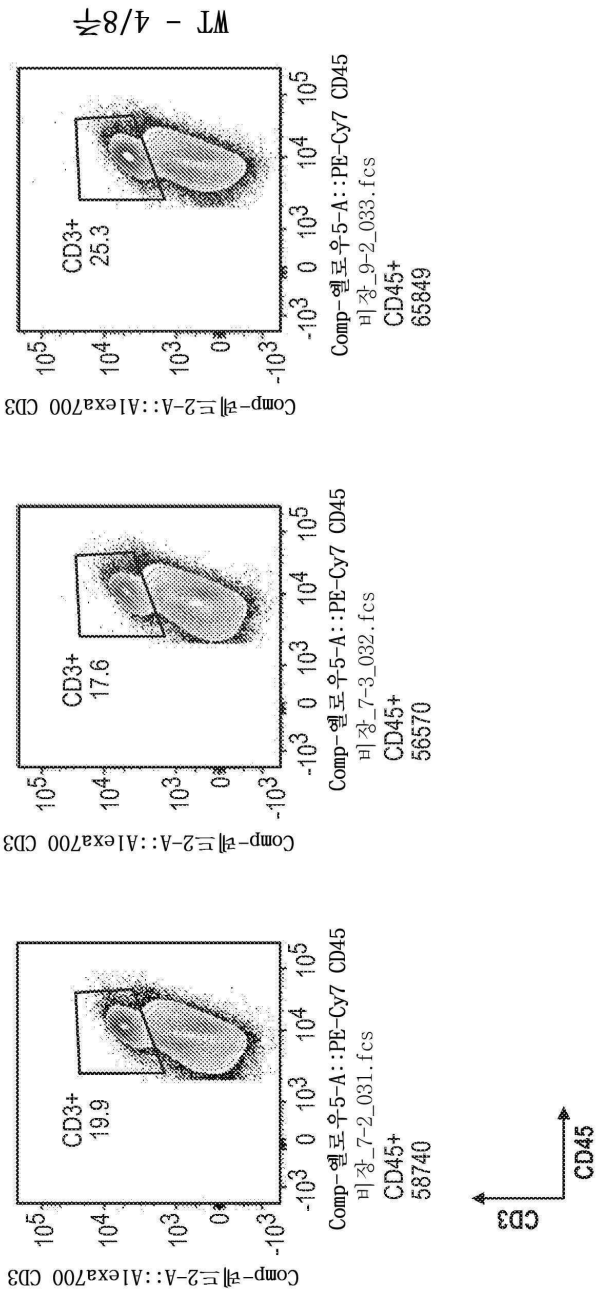
도면20d


혈액 호중구 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

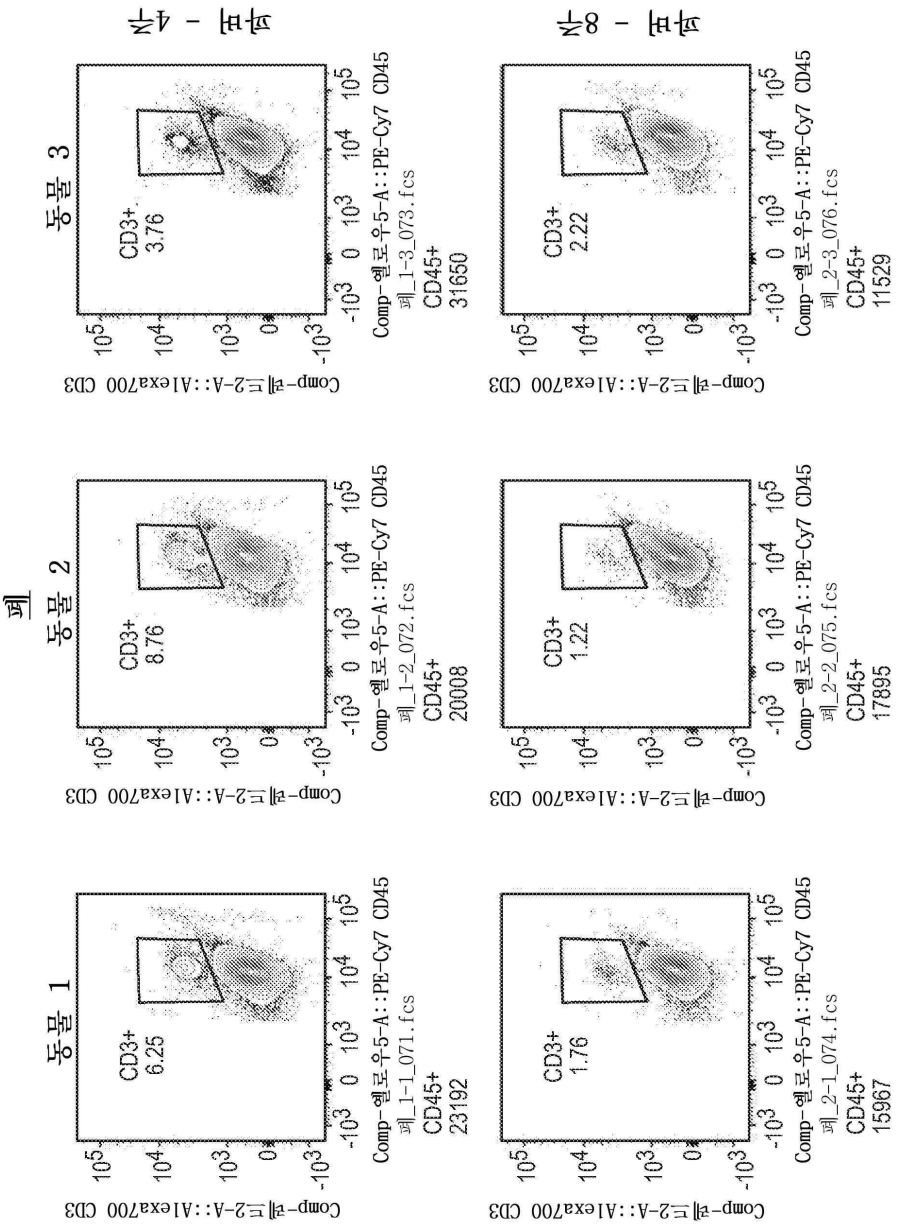
도면21a


비장
동물 1
동물 2
동물 3
CD3+
9.22
10.6
11.0
CD45+
39680
40106
54799
비장_1-1_025.fcs
비장_1-2_026.fcs
비장_1-3_027.fcs
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-헬로우2-A::Alexa700 CD3
코버 - 8주
코버 - 4주
CD3+
7.89
5.97
8.17
CD45+
58824
26921
44686
비장_2-1_028.fcs
비장_2-2_029.fcs
비장_2-3_030.fcs

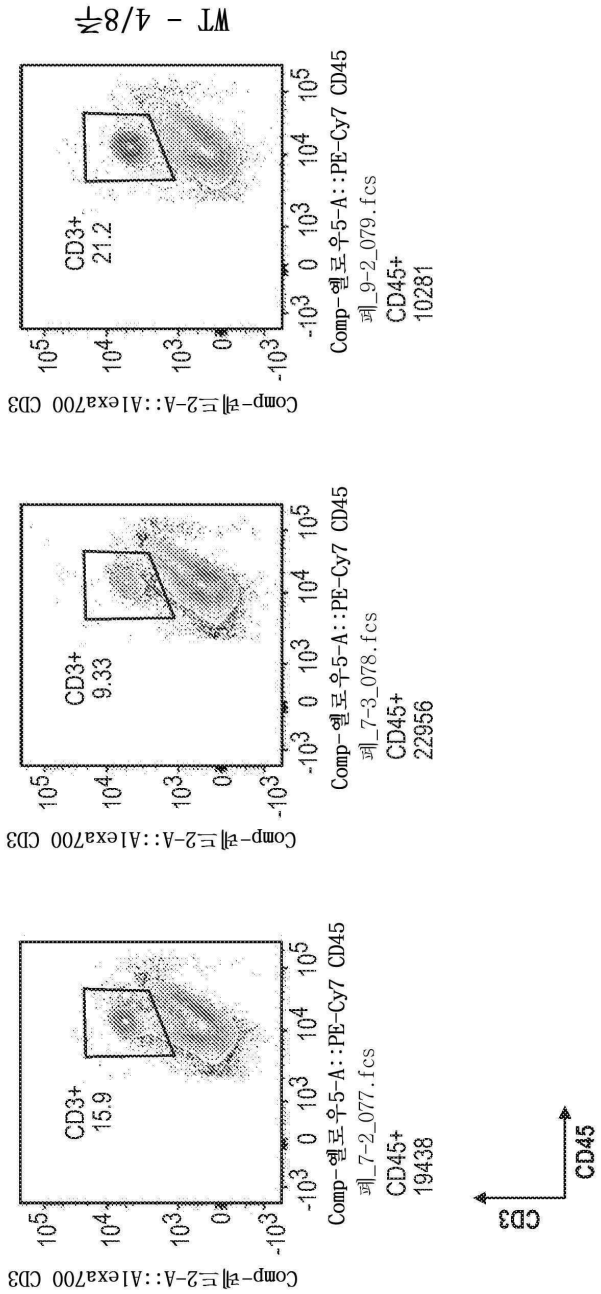
도면21b


WT - 4/8주
CD3+
25.3
CD45+
65849
CD3+
17.6
CD45+
56570
CD3+
19.9
CD45+
58740
CD3
CD45

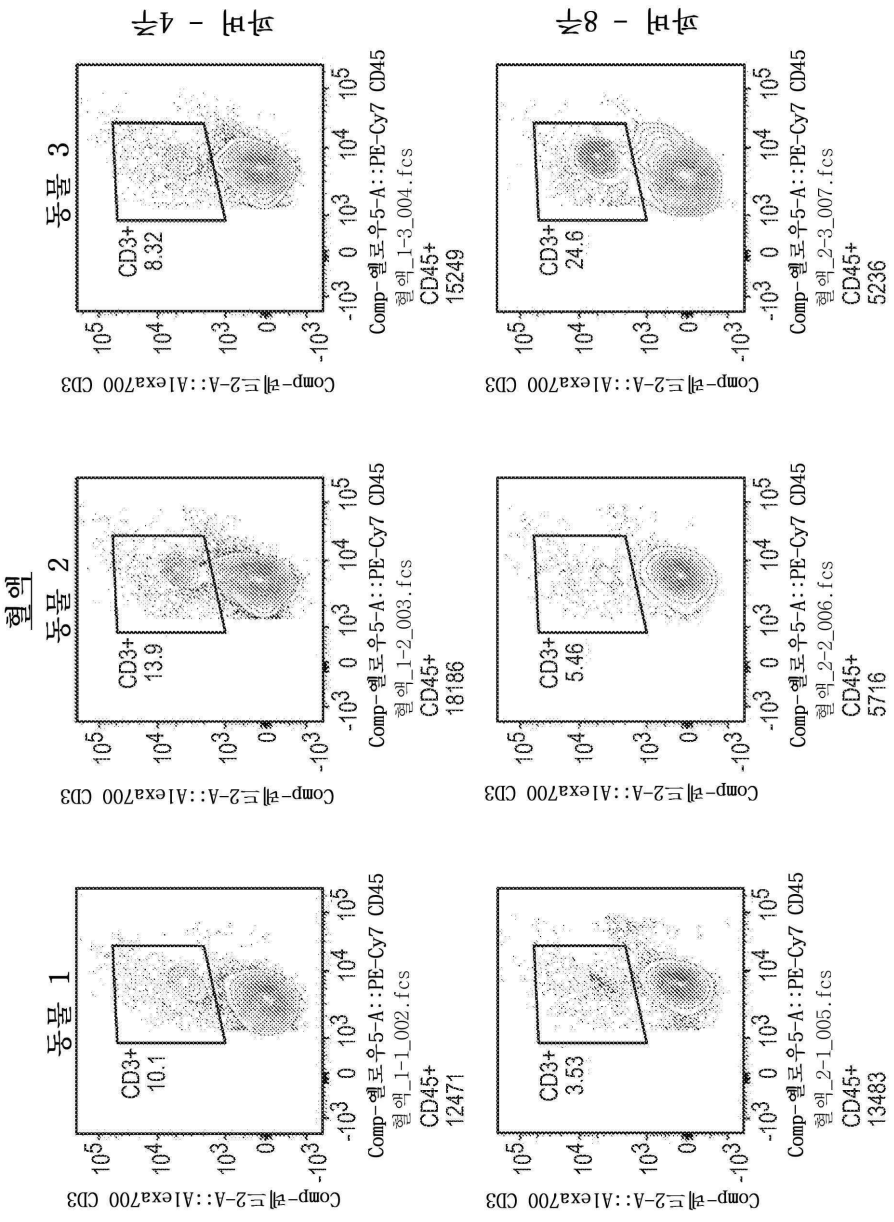
도면22a


폐
동물 1
동물 2
동물 3
파부 - 4주
파부 - 8주
CD3+
6.25
CD45+
23192
폐_1-1_071.fcs
CD3+
8.76
CD45+
20008
폐_1-2_072.fcs
CD3+
3.76
CD45+
31650
폐_1-3_073.fcs
CD3+
1.76
CD45+
15967
폐_2-1_074.fcs
CD3+
1.22
CD45+
17895
폐_2-2_075.fcs
CD3+
2.22
CD45+
11529
폐_2-3_076.fcs
Comp-폐ㅌ2-A::AlexaFluor700 CD3
Comp-엘로우-5-A::PE-Cy7 CD45

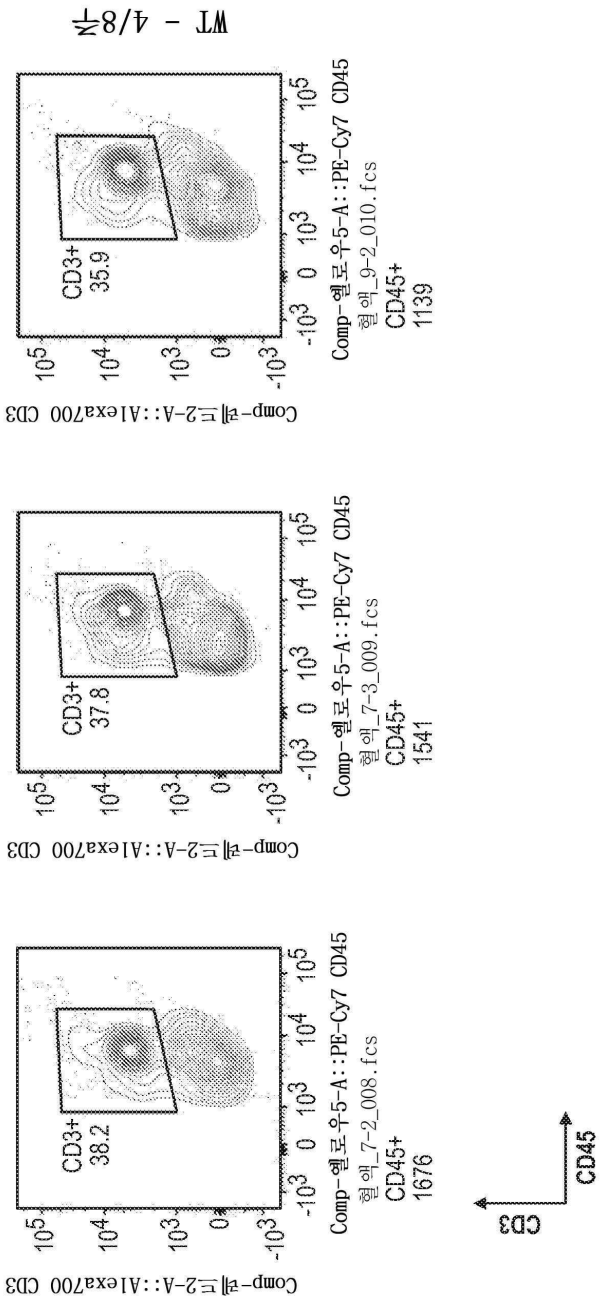
도면22b


WT - 4/8주
Comp-퍼킨2-A::Alexa700 CD3
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD3+
21.2
CD45+
10281
파_9-2_079.fcs
Comp-퍼킨2-A::Alexa700 CD3
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD3+
9.33
CD45+
22956
파_7-3_078.fcs
Comp-퍼킨2-A::Alexa700 CD3
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD3+
15.9
CD45+
19438
파_7-2_077.fcs
CD3
CD45

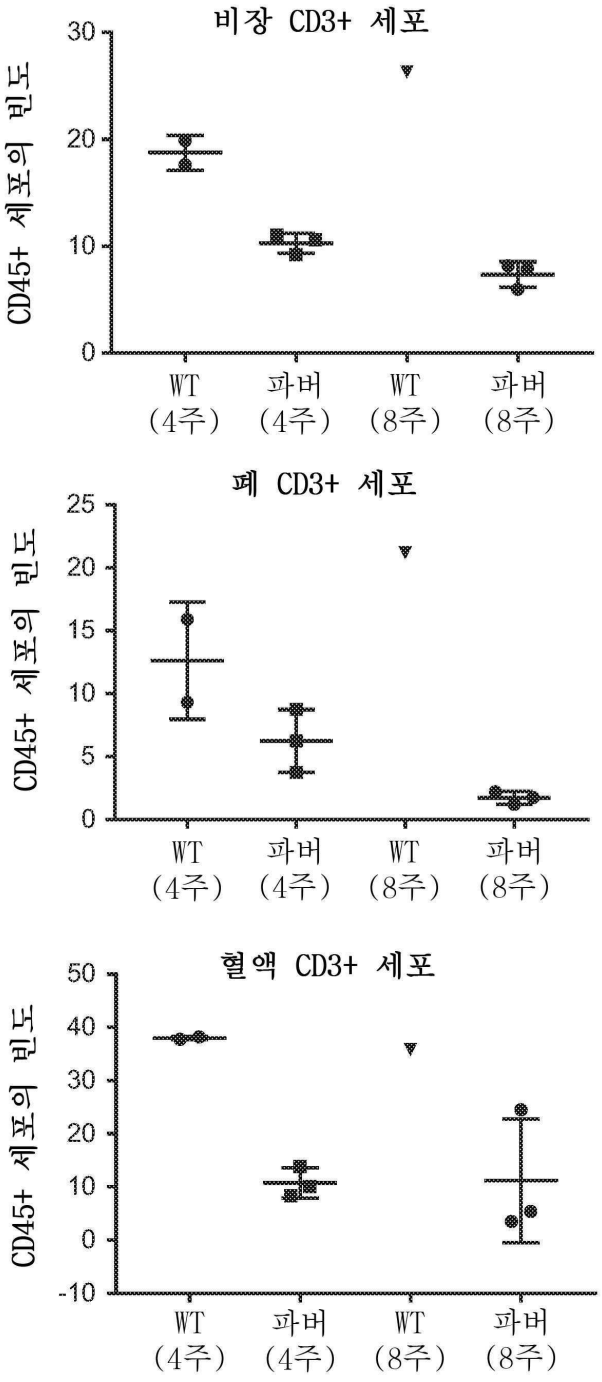
도면23a


혈액
동물 1
동물 2
동물 3
8주
4주
CD3+
10.1
CD45+
12471
CD3+
13.9
CD45+
18186
CD3+
8.32
CD45+
15249
CD3+
5.46
CD45+
5716
CD3+
3.53
CD45+
13483
CD3+
24.6
CD45+
5236
Comp-셀로우5-A::PE-Cy7 CD45
Comp-셀로우2-A::Alexa700 CD3
혈액_1-1_002.fcs
혈액_1-2_003.fcs
혈액_1-3_004.fcs
혈액_2-2_006.fcs
혈액_2-3_007.fcs
혈액_2-1_005.fcs

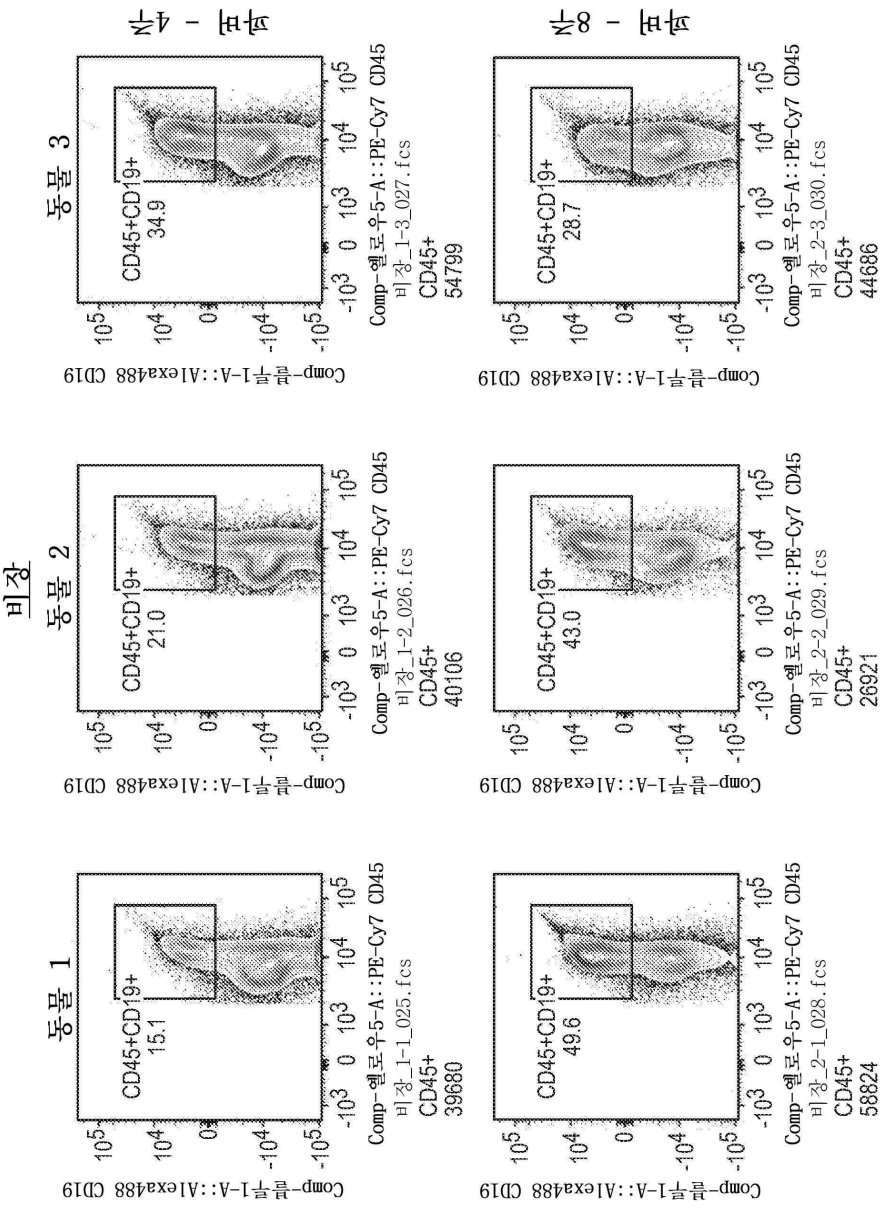
도면23b


WT - 4/8주
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_9-2_010.fcs
CD45+
1139
CD3+
35.9
Comp-헬로우2-A::Alexa700 CD3
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_7-3_009.fcs
CD45+
1541
CD3+
37.8
Comp-헬로우2-A::Alexa700 CD3
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
혈액_7-2_008.fcs
CD45+
1676
CD3+
38.2
Comp-헬로우2-A::Alexa700 CD3
CD3
CD45

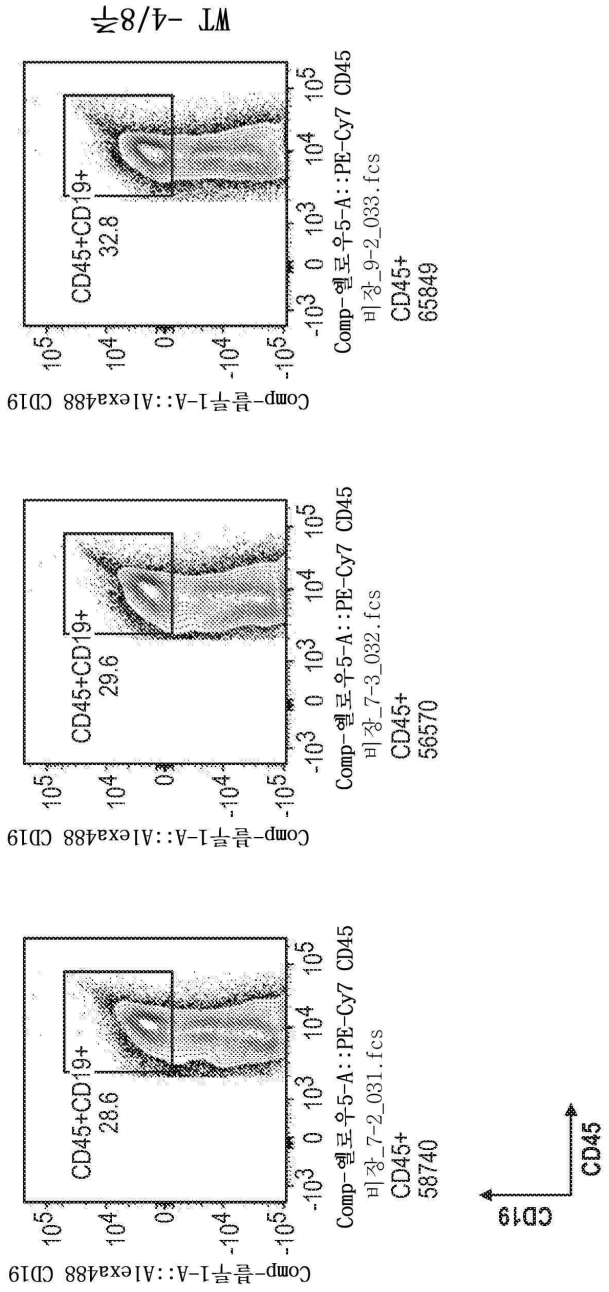
도면24


비장 CD3+ 세포
CD45+ 세포의 빈도
30
20
10
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)
폐 CD3+ 세포
CD45+ 세포의 빈도
25
20
15
10
5
0
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)
혈액 CD3+ 세포
CD45+ 세포의 빈도
50
40
30
20
10
0
-10
WT (4주)
파버 (4주)
WT (8주)
파버 (8주)

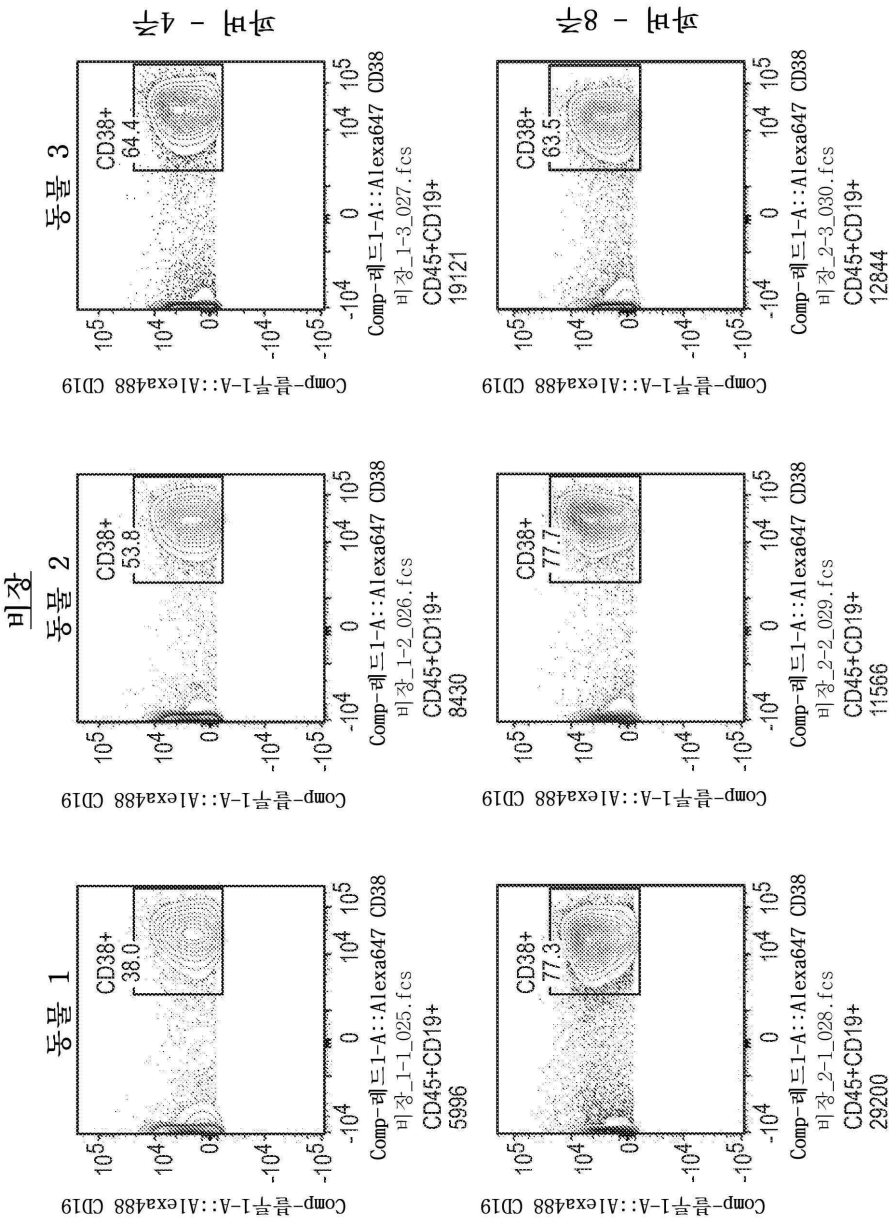
도면25a


비장
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 8주
파버 - 4주
CD45+CD19+
15.1
21.0
34.9
43.0
49.6
28.7
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-옐로우5-A::PE-Cy7 CD45
비장_1-1_025.fcs
비장_1-2_026.fcs
비장_1-3_027.fcs
비장_2-2_029.fcs
비장_2-1_028.fcs
비장_2-3_030.fcs
CD45+
39680
40106
54799
26921
58824
44686

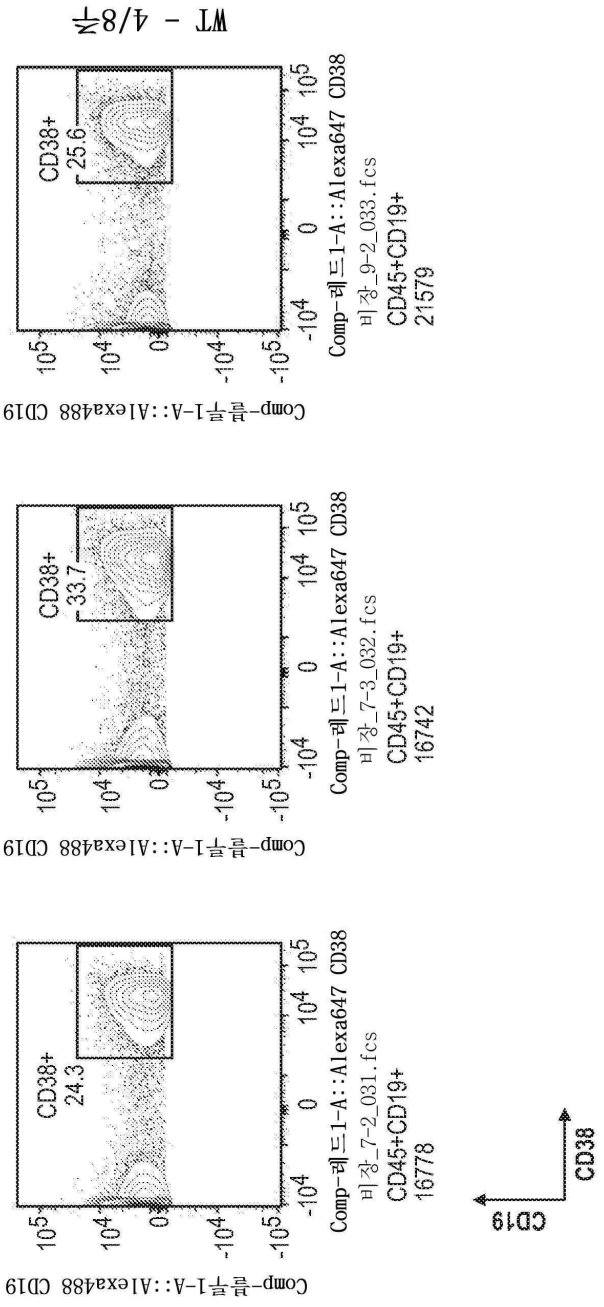
도면25b


WT -4/8주
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD45+CD19+
32.8
비장_9-2_033.fcs
CD45+
65849
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD45+CD19+
29.6
비장_7-3_032.fcs
CD45+
56570
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
CD45+CD19+
28.6
비장_7-2_031.fcs
CD45+
58740
CD19
CD45

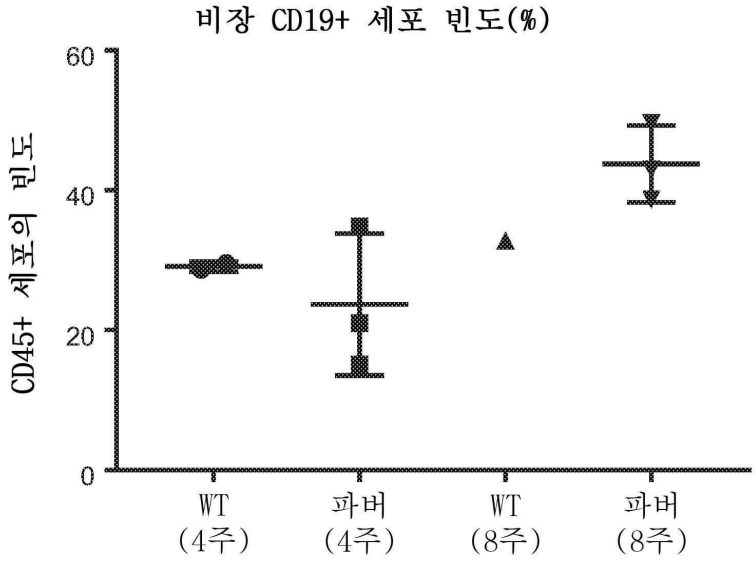
도면26a


비장
동물 1
동물 2
동물 3
CD38+
38.0
53.8
64.4
77.3
77.7
63.5
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-레드1-A::Alexa647 CD38
비장_1-1_025.fcs
비장_1-2_026.fcs
비장_1-3_027.fcs
비장_2-1_028.fcs
비장_2-2_029.fcs
비장_2-3_030.fcs
CD45+CD19+
5996
8430
19121
29200
11566
12844
파버 - 4주
파버 - 8주

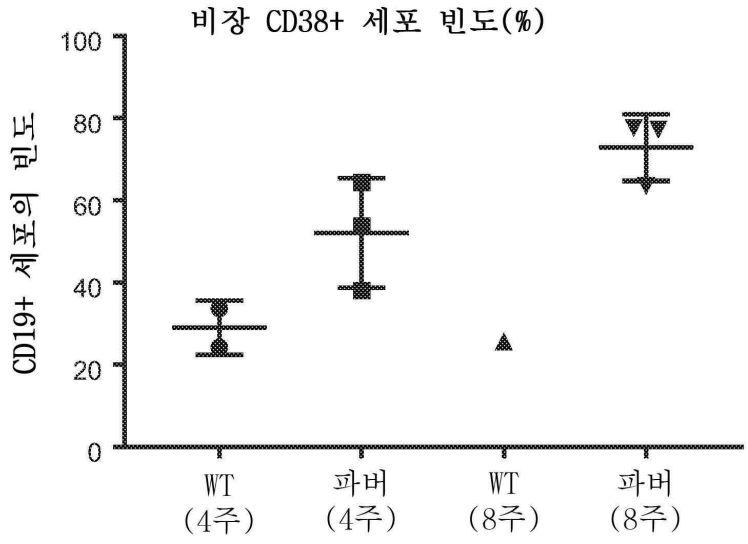
도면26b


WT - 4/8주
CD38+
25.6
Comp-블루1-A::Alexa647 CD38
비장_9-2_033.fcs
CD45+CD19+
21579
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD38+
33.7
Comp-블루1-A::Alexa647 CD38
비장_7-3_032.fcs
CD45+CD19+
16742
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD38+
24.3
Comp-블루1-A::Alexa647 CD38
비장_7-2_031.fcs
CD45+CD19+
16778
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD19
CD38

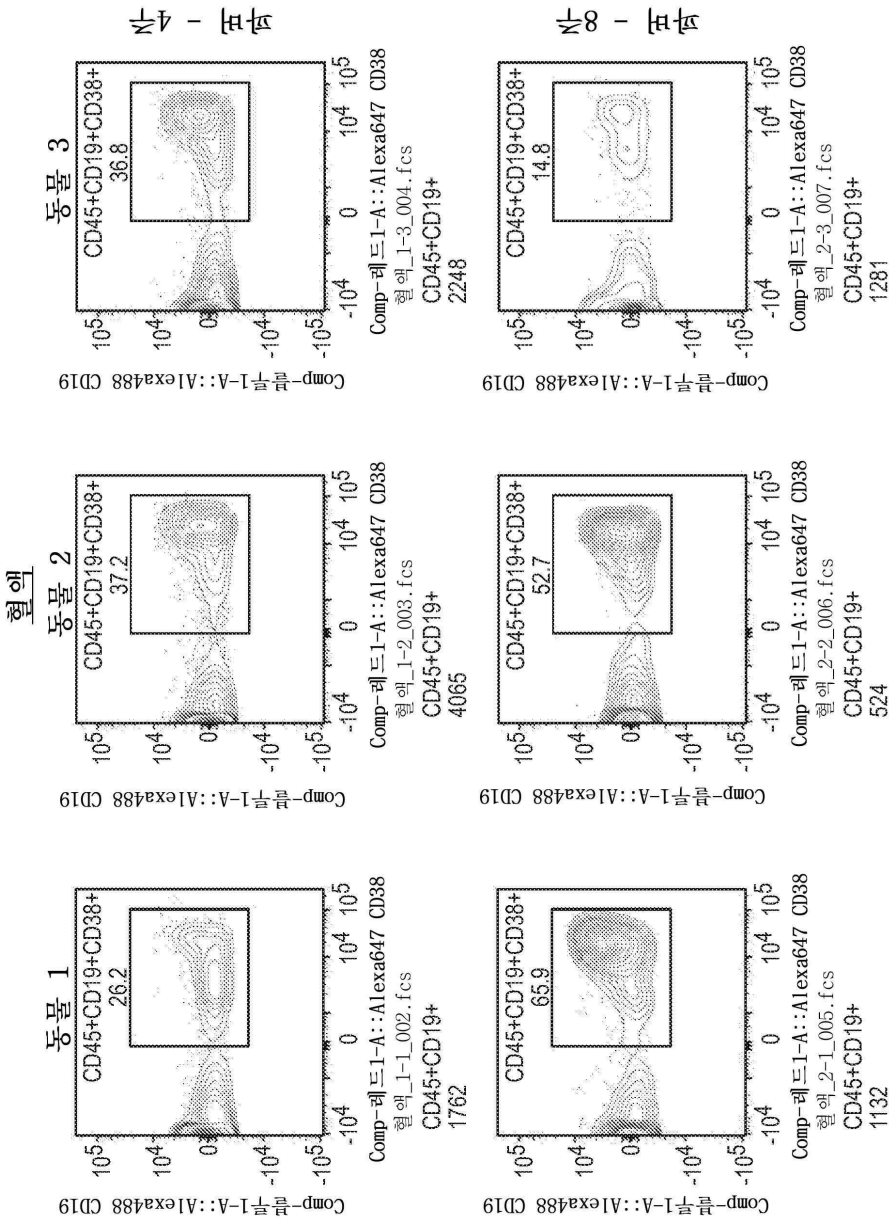
도면27a


비장 CD19+ 세포 빈도(%)
CD45+ 세포의 빈도
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

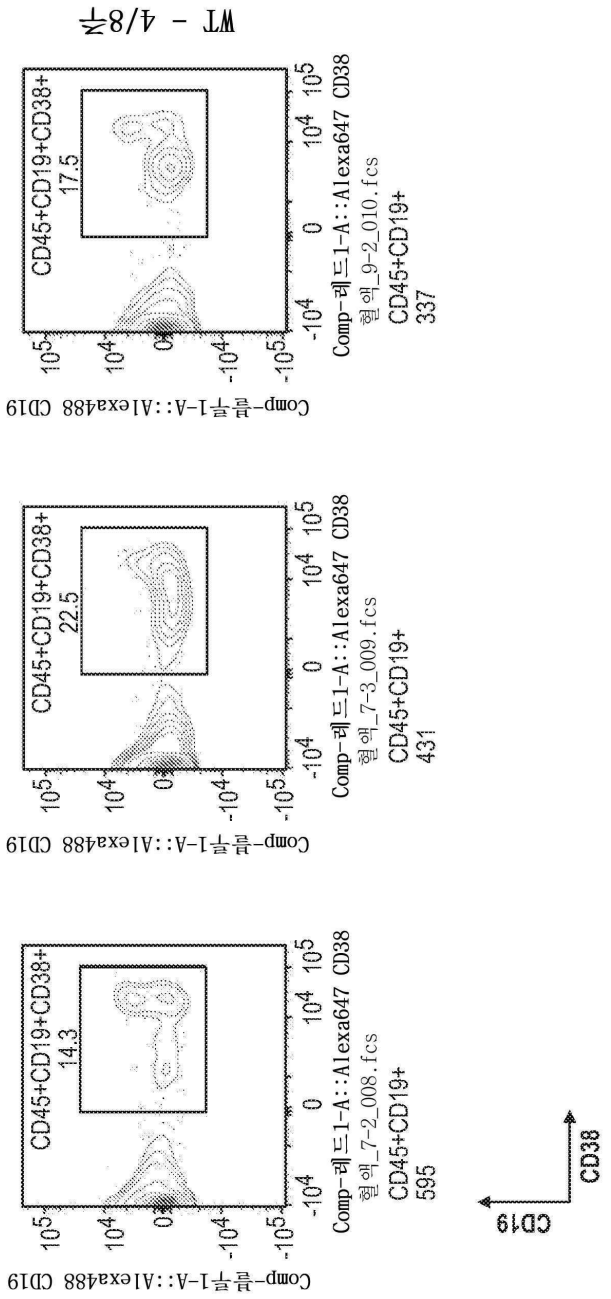
도면27b


비장 CD38+ 세포 빈도(%)
CD19+ 세포의 빈도
100
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

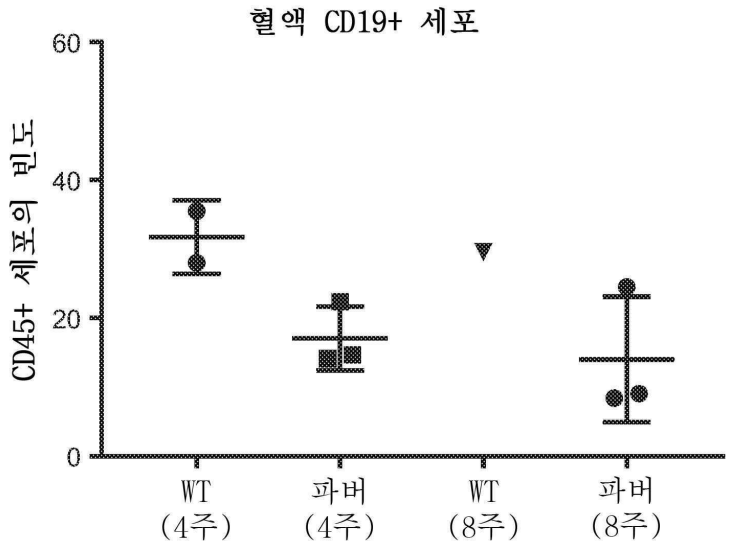
도면28a


파버 - 8주
파버 - 4주
혈액
동물 1
동물 2
동물 3
CD45+CD19+CD38+
26.2
37.2
36.8
52.7
65.9
14.8
CD45+CD19+
1762
4065
2248
524
1132
1281
혈액_1-1_002.fcs
혈액_1-2_003.fcs
혈액_1-3_004.fcs
혈액_2-2_006.fcs
혈액_2-1_005.fcs
혈액_2-3_007.fcs
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
Comp-레드1-A::Alexa647 CD38

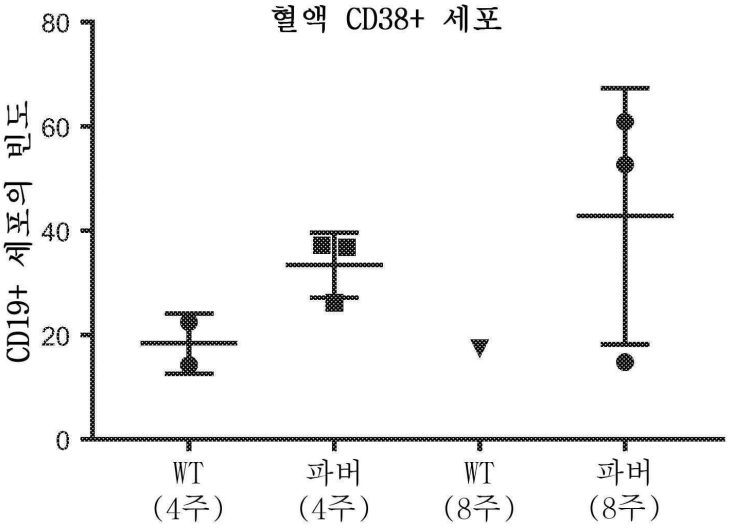
도면28b


WT - 4/8주
CD45+CD19+CD38+
17.5
Comp-레드1-A::Alexa647 CD38
혈액_9-2_010.fcs
CD45+CD19+
337
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD45+CD19+CD38+
22.5
Comp-레드1-A::Alexa647 CD38
혈액_7-3_009.fcs
CD45+CD19+
431
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD45+CD19+CD38+
14.3
Comp-레드1-A::Alexa647 CD38
혈액_7-2_008.fcs
CD45+CD19+
595
Comp-블루1-A::Alexa488 CD19
CD19
CD38

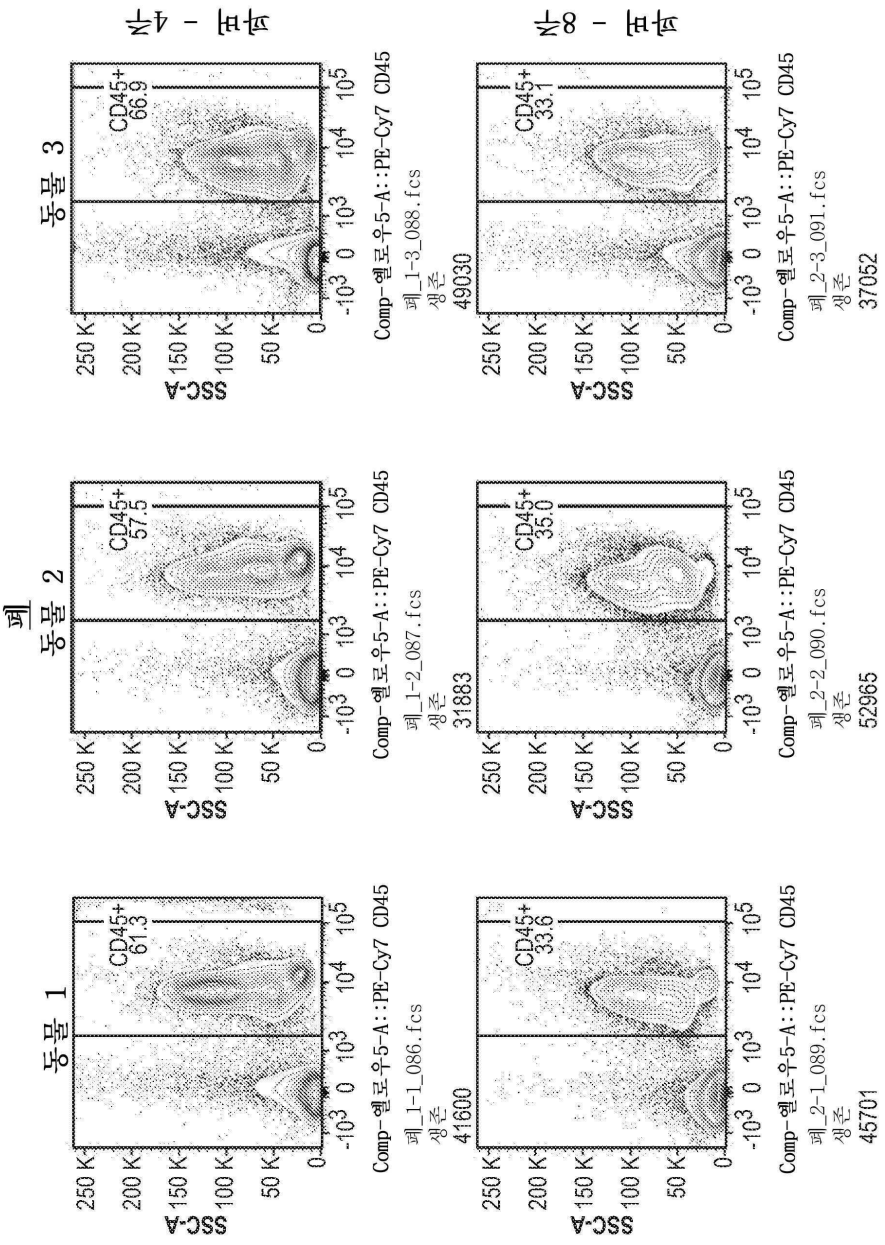
도면29a


혈액 CD19+ 세포
CD45+ 세포의 빈도
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

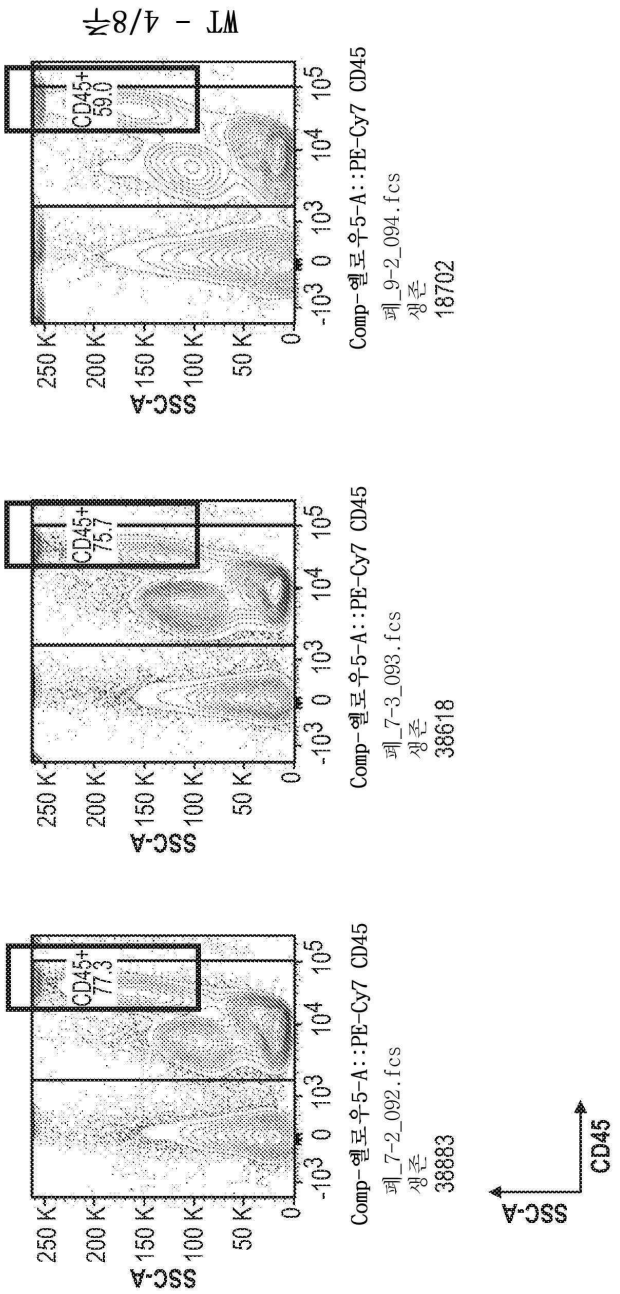
도면29b


혈액 CD38+ 세포
CD19+ 세포의 빈도
80
60
40
20
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

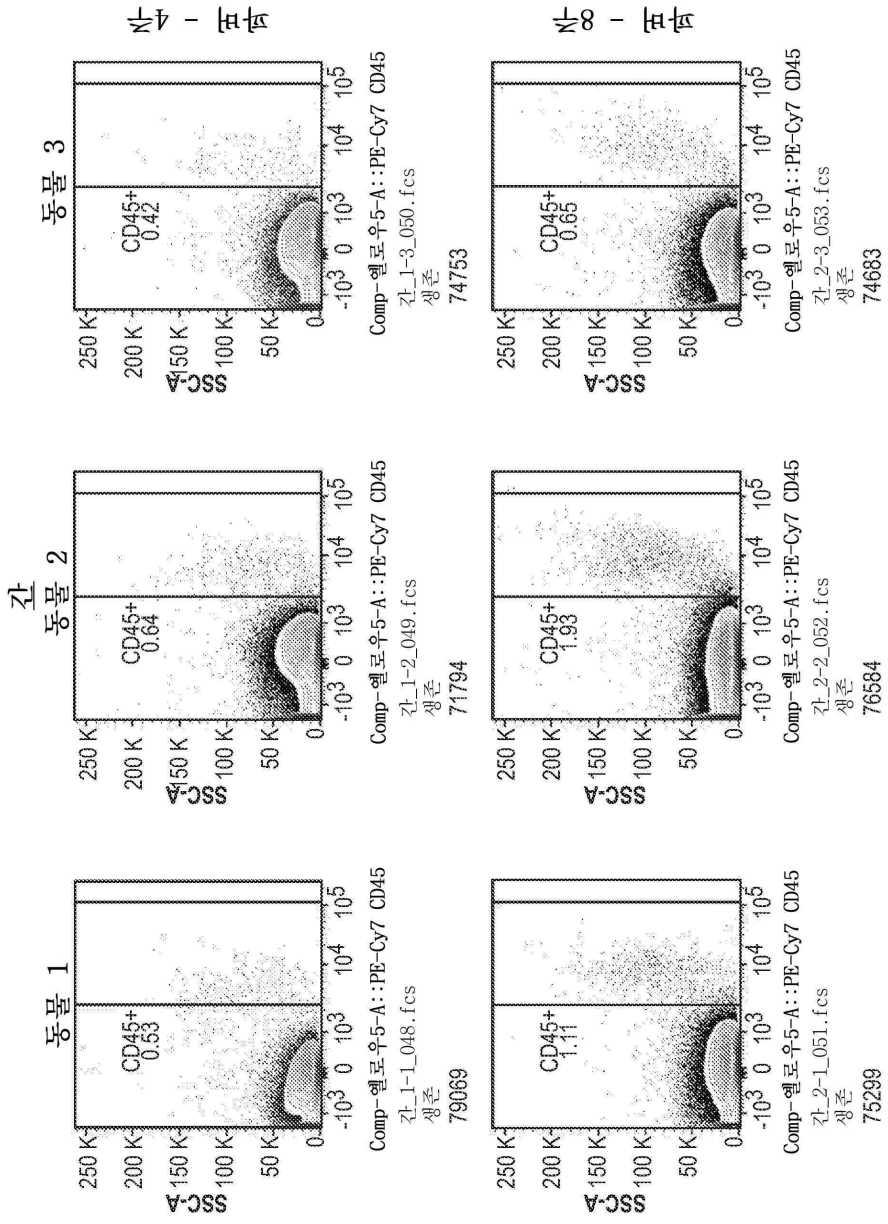
도면30aa


폐
동물 1
동물 2
동물 3
CD45+ 61.3
CD45+ 33.6
CD45+ 57.5
CD45+ 35.0
CD45+ 66.9
CD45+ 33.1
SSC-A
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
폐_1-1_086.fcs
폐_1-2_087.fcs
폐_1-3_088.fcs
폐_2-1_089.fcs
폐_2-2_090.fcs
폐_2-3_091.fcs
생존
41600
31883
49030
45701
52965
37052
폐부 - 8주
폐부 - 4주

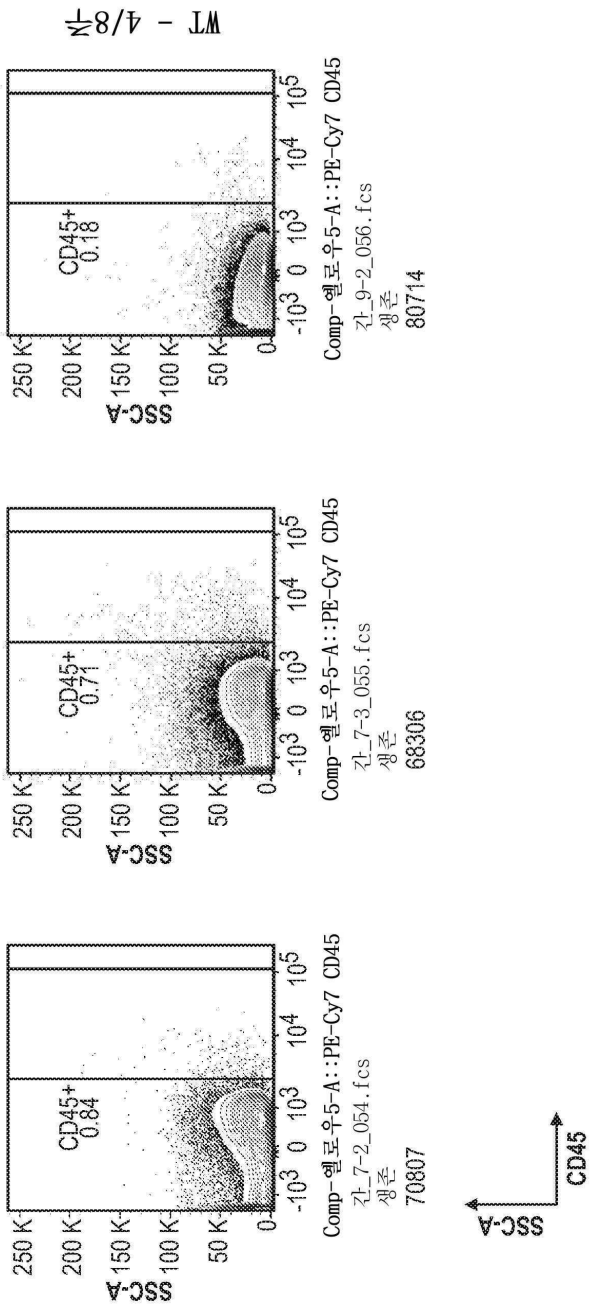
도면30ab


WT - 4/8주
SSC-A
CD45
CD45+
77.3
CD45+
75.7
CD45+
59.0
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
폐_7-2_092.fcs
생존
38883
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
폐_7-3_093.fcs
생존
38618
Comp-헬로우5-A::PE-Cy7 CD45
폐_9-2_094.fcs
생존
18702

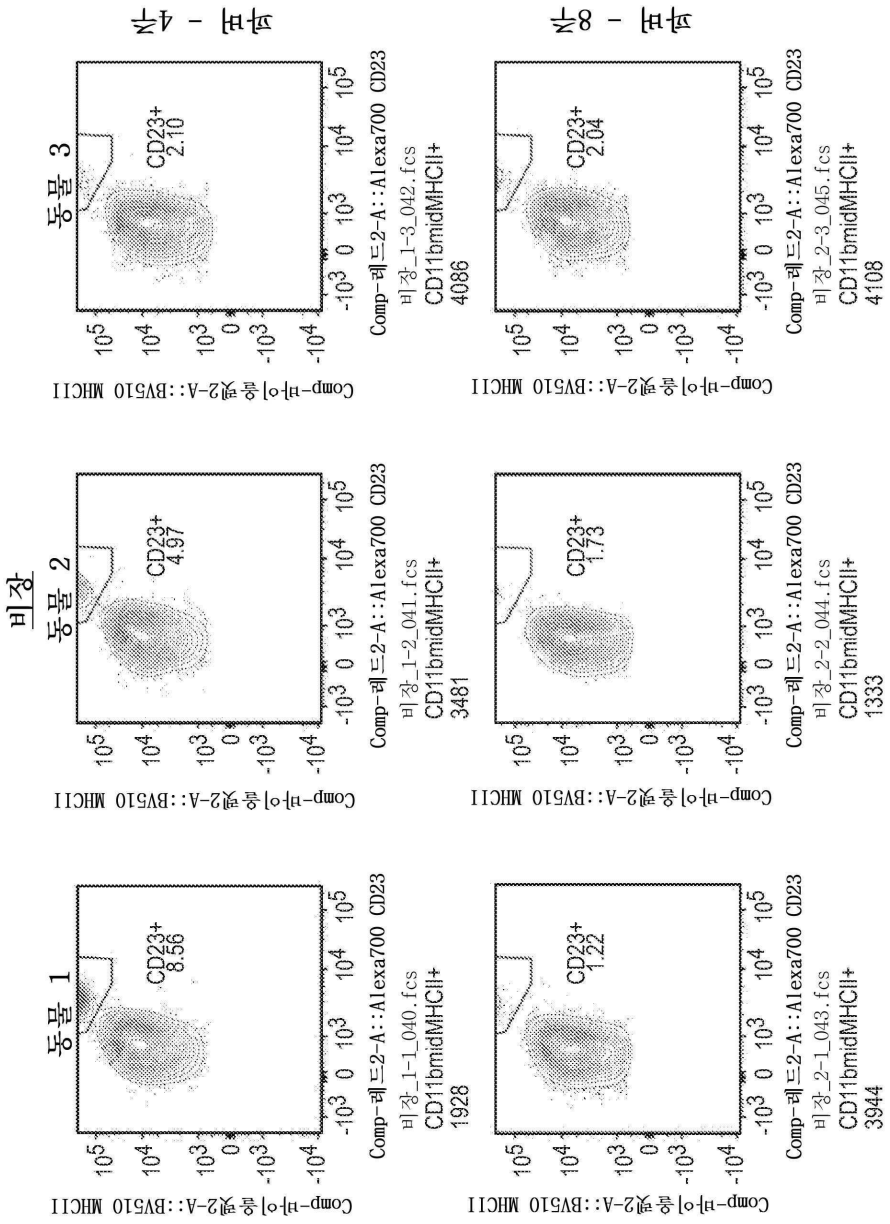
도면30ba


간
동물 1
동물 2
동물 3
파버 - 4주
파버 - 8주
SSC-A
CD45+
0.53
1.11
0.64
1.93
0.42
0.65
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
간_1-1_048.fcs
간_2-1_051.fcs
간_1-2_049.fcs
간_2-2_052.fcs
간_1-3_050.fcs
간_2-3_053.fcs
생존
79069
75299
71794
76584
74753
74683

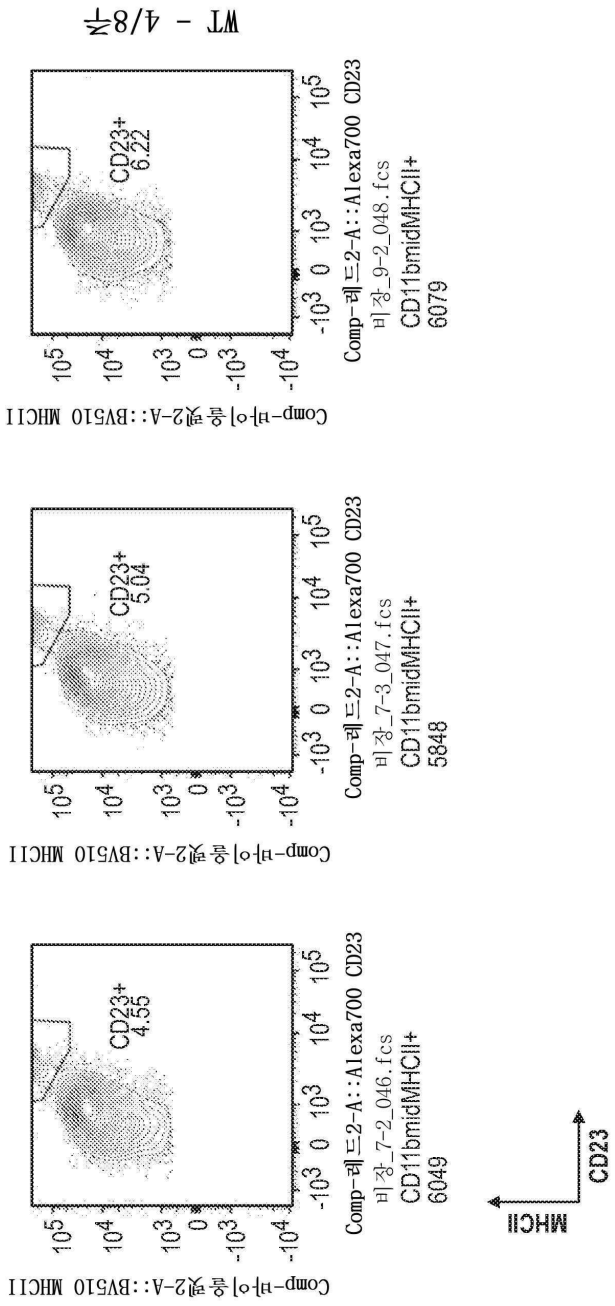
도면30bb


WT - 4/8주
SSC-A
CD45
CD45+
0.84
CD45+
0.71
CD45+
0.18
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
간_7-2_054.fcs
생존
70807
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
간_7-3_055.fcs
생존
68306
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
간_9-2_056.fcs
생존
80714

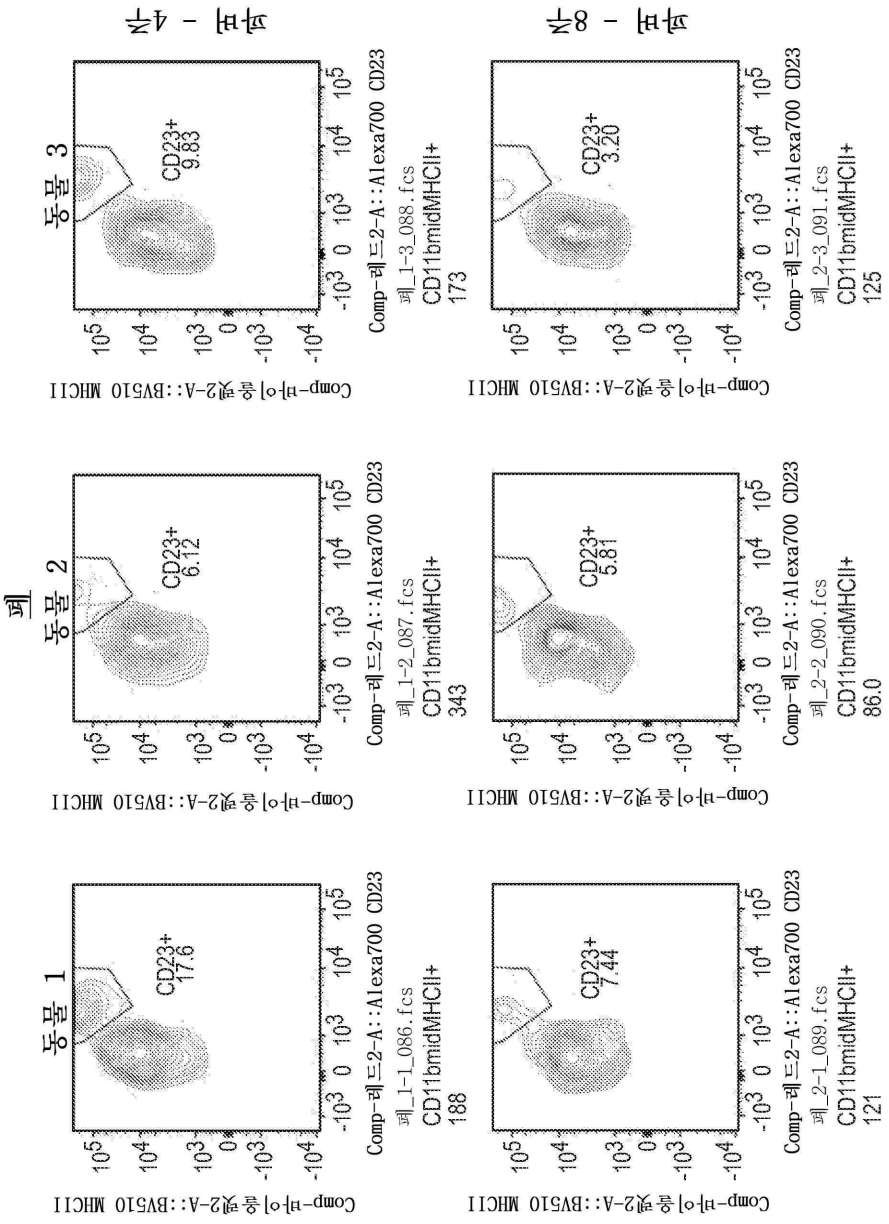
도면31a


비장
동물 1
동물 2
동물 3
CD23+ 8.56
CD23+ 4.97
CD23+ 2.10
CD23+ 1.22
CD23+ 1.73
CD23+ 2.04
비장_1-1_040.fcs
비장_1-2_041.fcs
비장_1-3_042.fcs
비장_2-1_043.fcs
비장_2-2_044.fcs
비장_2-3_045.fcs
CD11bmidMHCII+
1928
3481
4086
3944
1333
4108
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
파버 - 4주
파버 - 8주

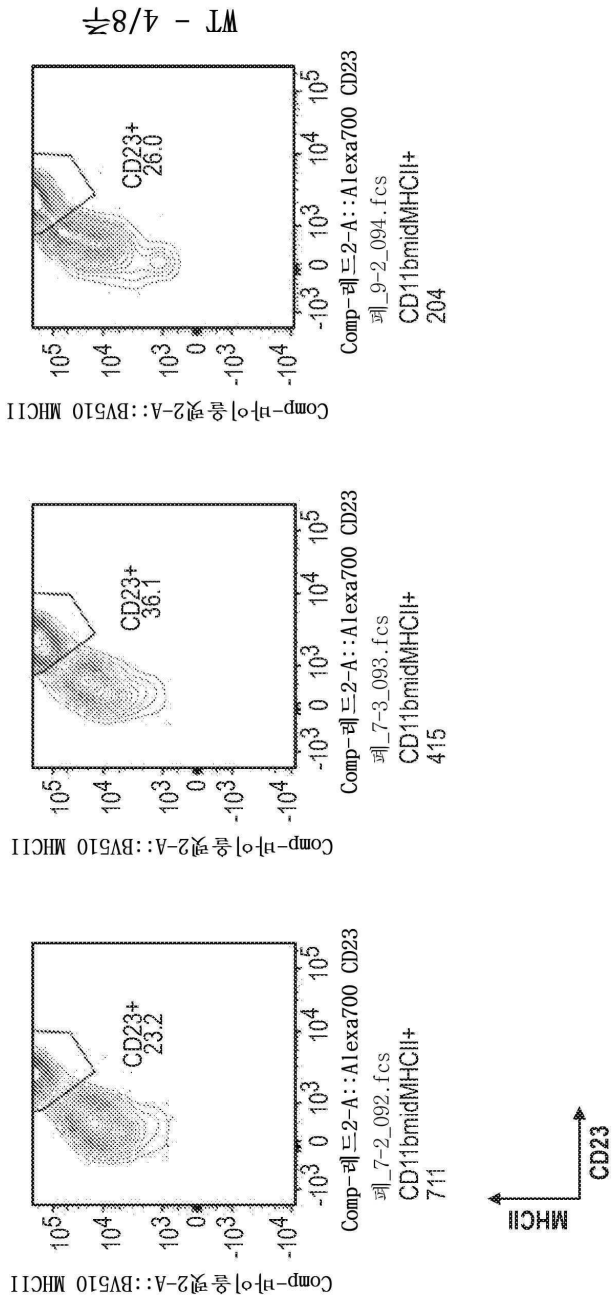
도면31b


WT - 4/8주
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
비장_9-2_048.fcs
CD11bmidMHCII+
6079
CD23+
6.22
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
비장_7-3_047.fcs
CD11bmidMHCII+
5848
CD23+
5.04
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
비장_7-2_046.fcs
CD11bmidMHCII+
6049
CD23+
4.55
MHCII
CD23

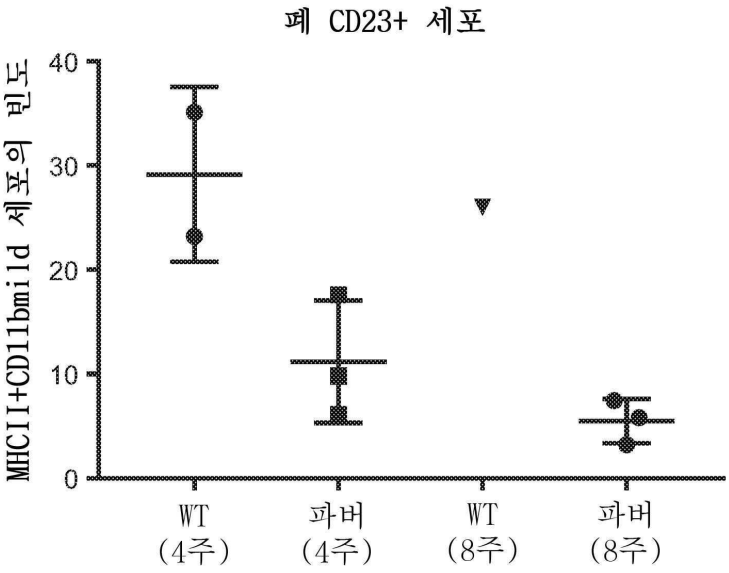
도면32aa


폐
동물 1
동물 2
동물 3
CD23+
17.6
CD23+
6.12
CD23+
9.83
CD23+
7.44
CD23+
5.81
CD23+
3.20
Comp-퍼플 울렛2-A::BV510 MHCII
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
폐_1-1_086.fcs
CD11bmidMHCII+
188
폐_1-2_087.fcs
CD11bmidMHCII+
343
폐_1-3_088.fcs
CD11bmidMHCII+
173
폐_2-1_089.fcs
CD11bmidMHCII+
121
폐_2-2_090.fcs
CD11bmidMHCII+
86.0
폐_2-3_091.fcs
CD11bmidMHCII+
125
폐부 - 4주
폐부 - 8주

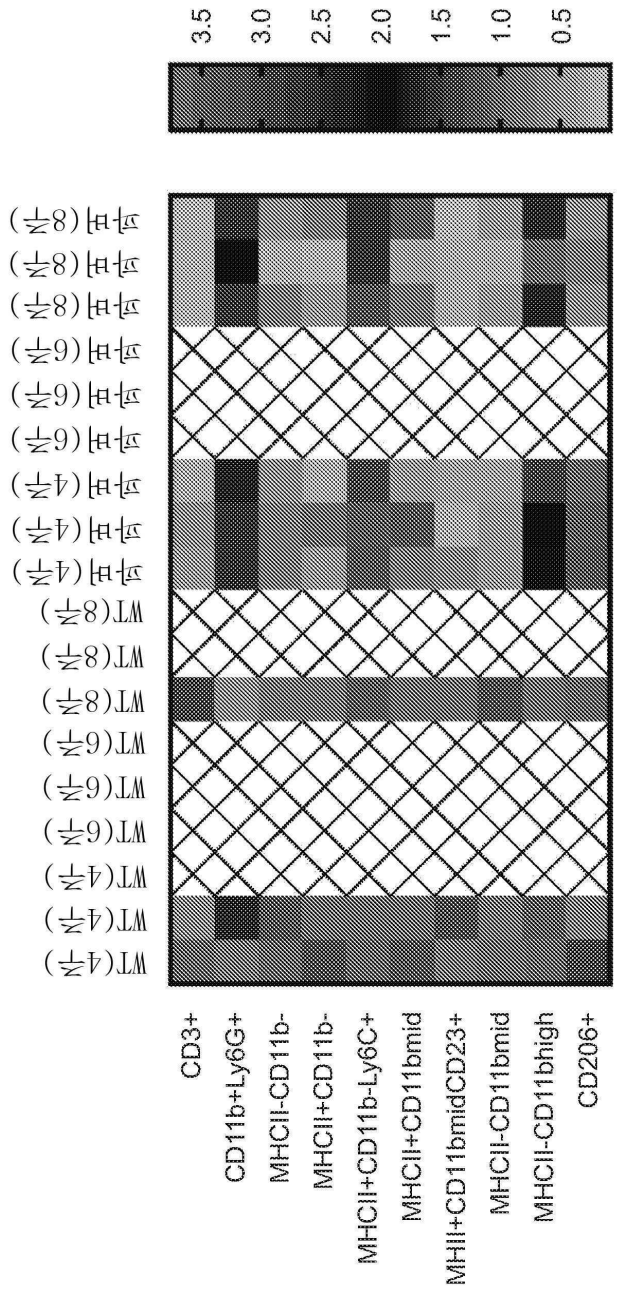
도면32ab


WT - 4/8주
CD23+
26.0
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
파_9-2_094.fcs
CD11bmidMHCII+
204
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
CD23+
36.1
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
파_7-3_093.fcs
CD11bmidMHCII+
415
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
CD23+
23.2
Comp-레드2-A::Alexa700 CD23
파_7-2_092.fcs
CD11bmidMHCII+
711
Comp-바이올렛2-A::BV510 MHCII
MHCII
CD23

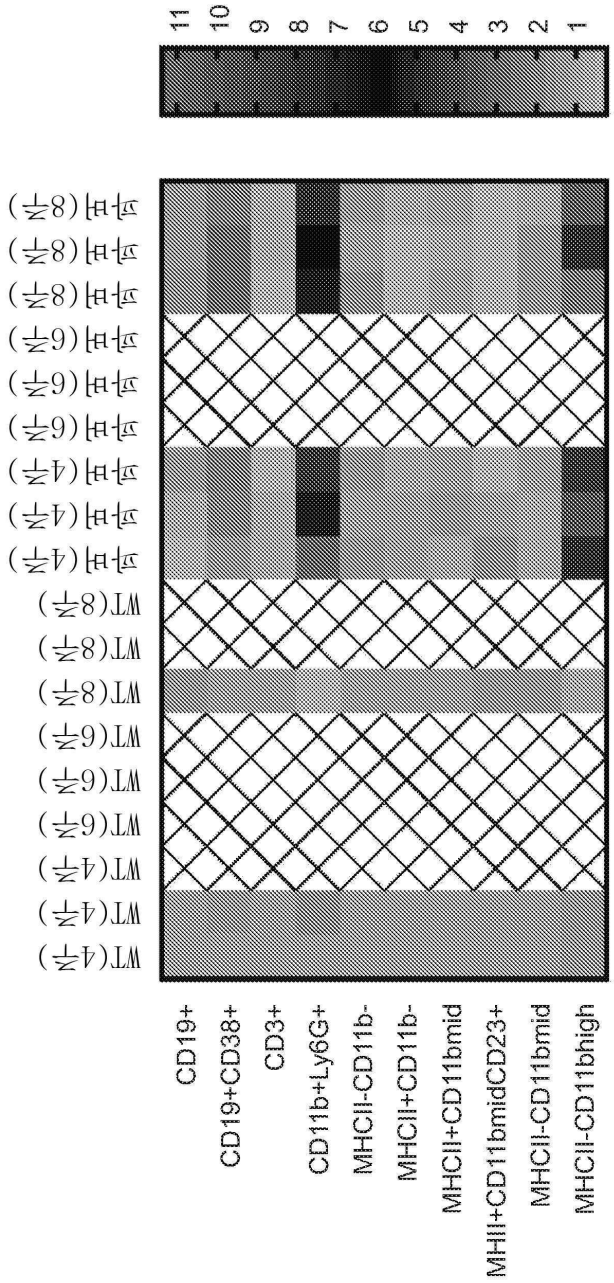
도면32b


폐 CD23+ 세포
MHCII+CD11bmild 세포의 빈도
40
30
20
10
0
WT
(4주)
파버
(4주)
WT
(8주)
파버
(8주)

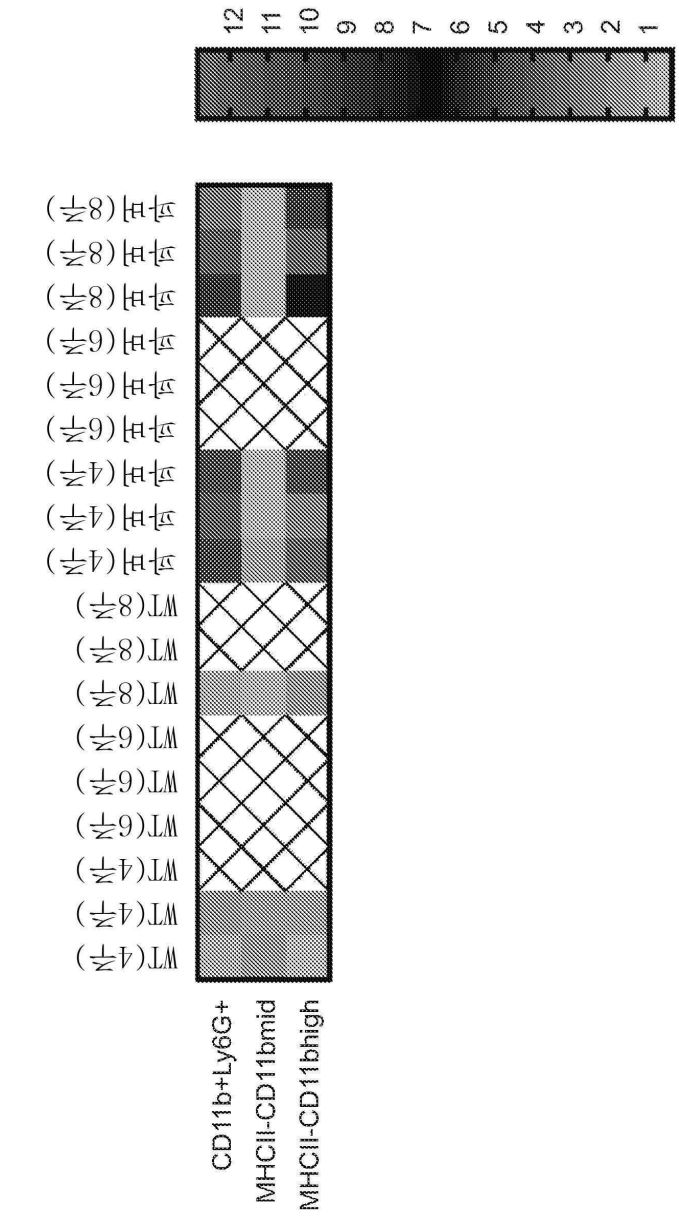
도면33a


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
CD3+
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11b-Ly6C+
MHCII+CD11bmid
MHII+CD11bmidCD23+
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhigh
CD206+
WT(4주)
WT(4주)
WT(4주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(8주)
WT(8주)
WT(8주)
파벼(4주)
파벼(4주)
파벼(4주)
파벼(6주)
파벼(6주)
파벼(6주)
파벼(8주)
파벼(8주)
파벼(8주)

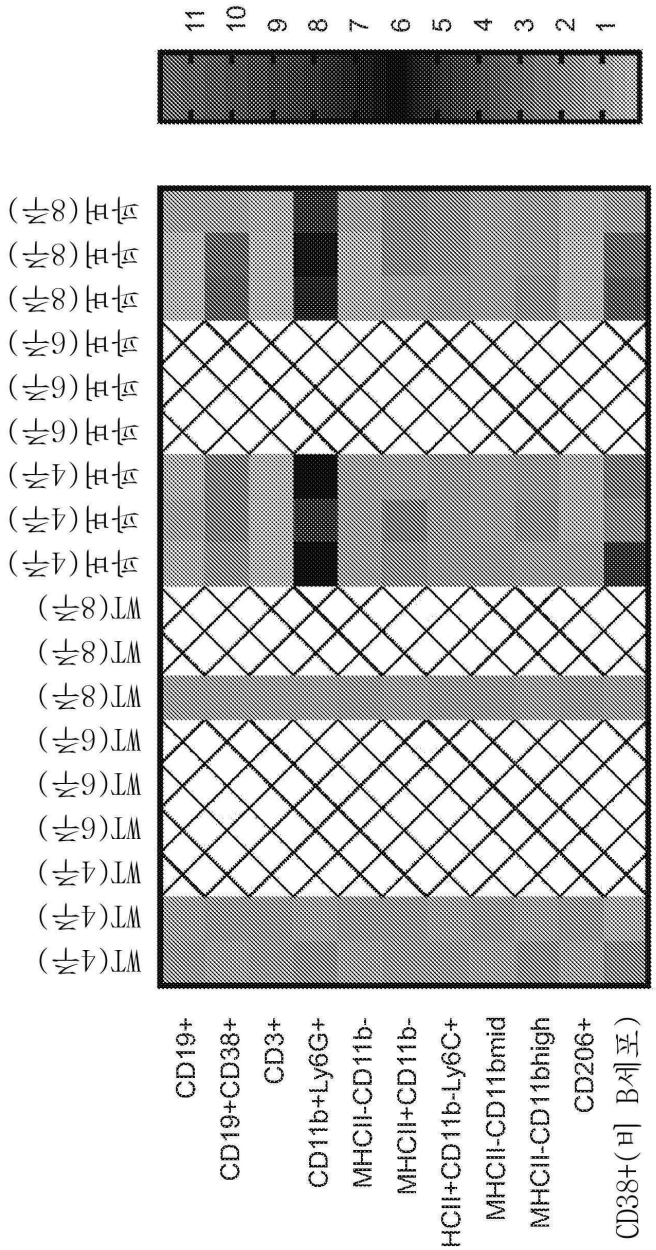
도면33b


11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
CD19+
CD19+CD38+
CD3+
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11bmid
MHII+CD11bmidCD23+
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhigh
WT(4주)
WT(4주)
WT(4주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(8주)
WT(8주)
WT(8주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(6주)
파버(6주)
파버(6주)
파버(8주)
파버(8주)
파버(8주)

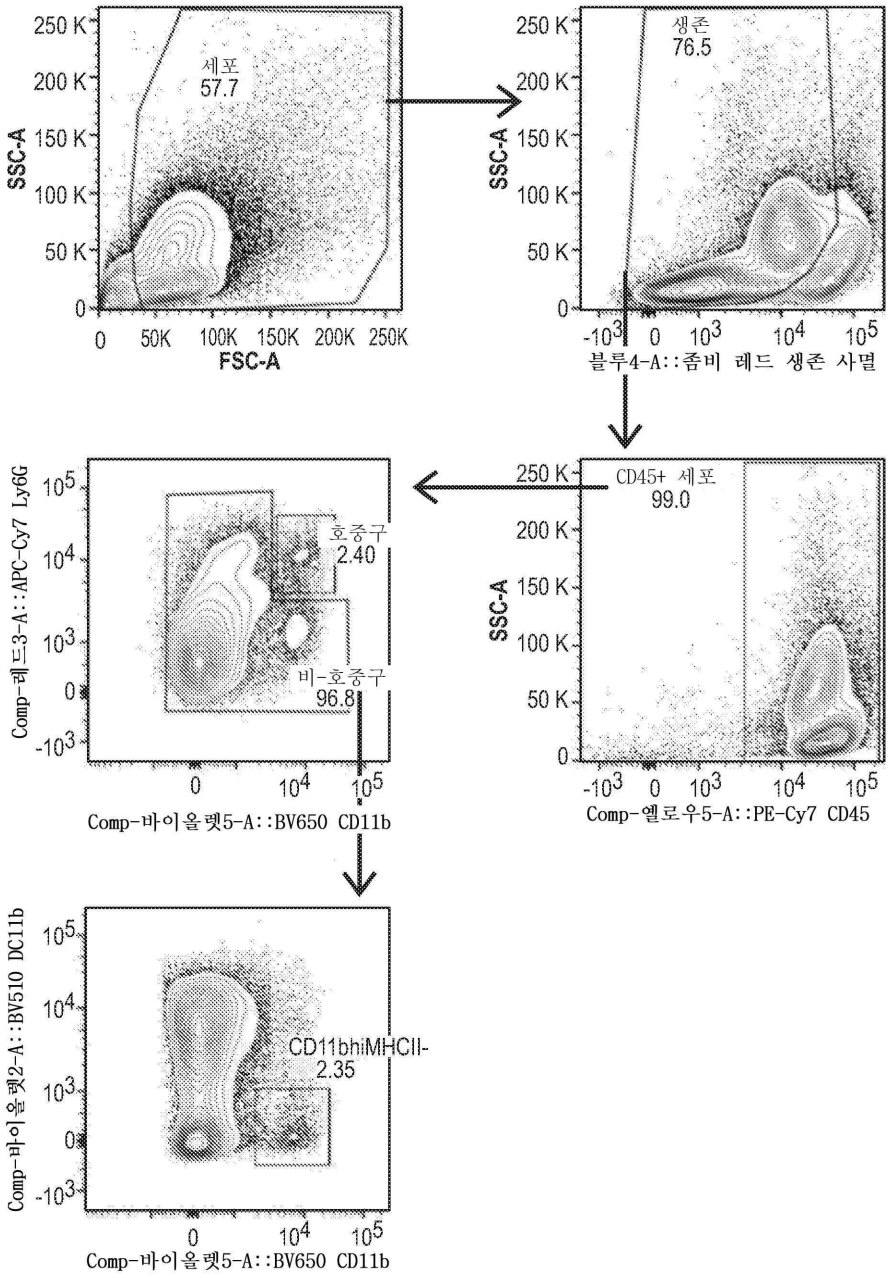
도면33c


12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhigh
WT(4주)
WT(4주)
WT(4주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(8주)
WT(8주)
WT(8주)
파벼(4주)
파벼(4주)
파벼(4주)
파벼(6주)
파벼(6주)
파벼(6주)
파벼(8주)
파벼(8주)
파벼(8주)

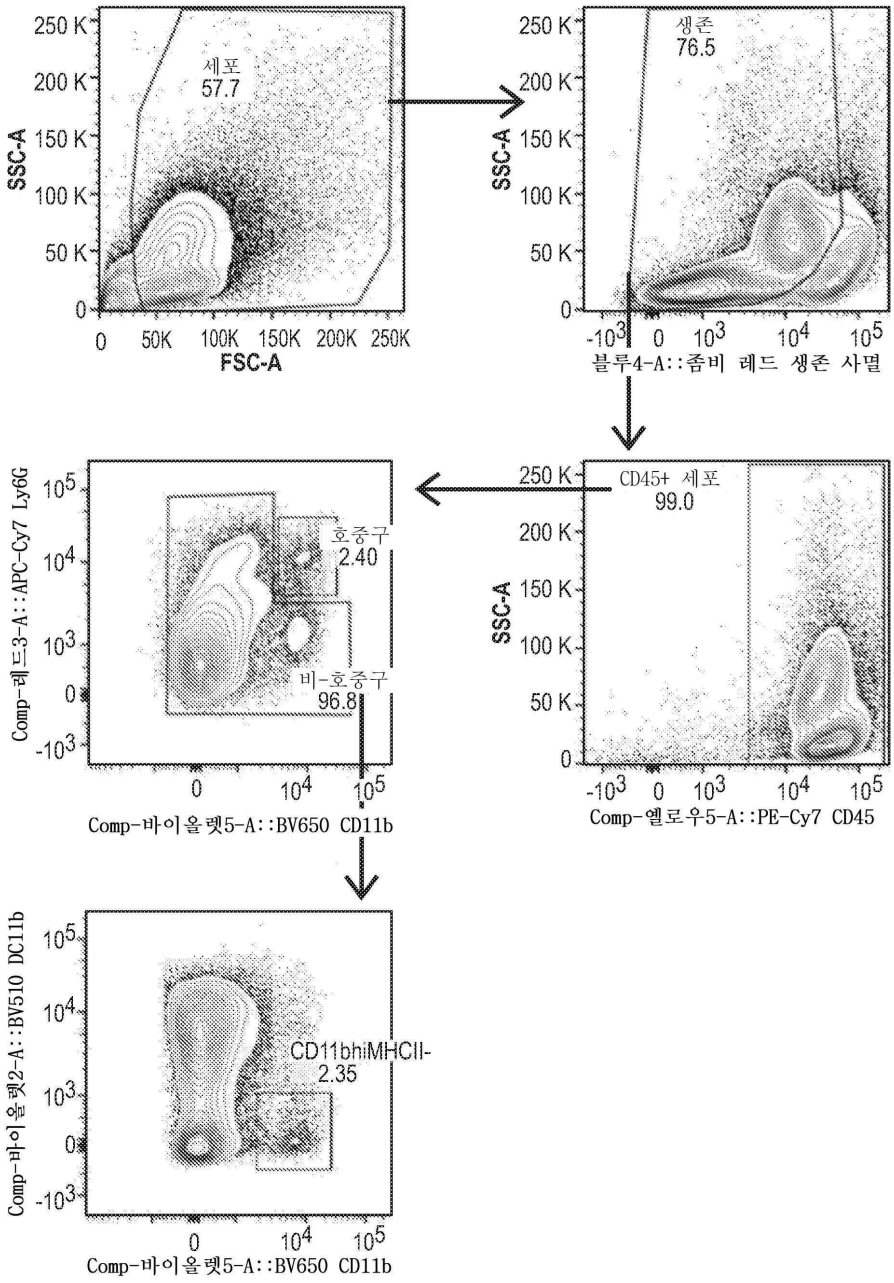
도면33d


11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
CD19+
CD19+CD38+
CD3+
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11b-Ly6C+
MHCII-CD11bmid
MHCII-CD11bhigh
CD206+
CD38+(B세포)
WT(4주)
WT(4주)
WT(4주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(6주)
WT(8주)
WT(8주)
WT(8주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(6주)
파버(6주)
파버(6주)
파버(8주)
파버(8주)
파버(8주)

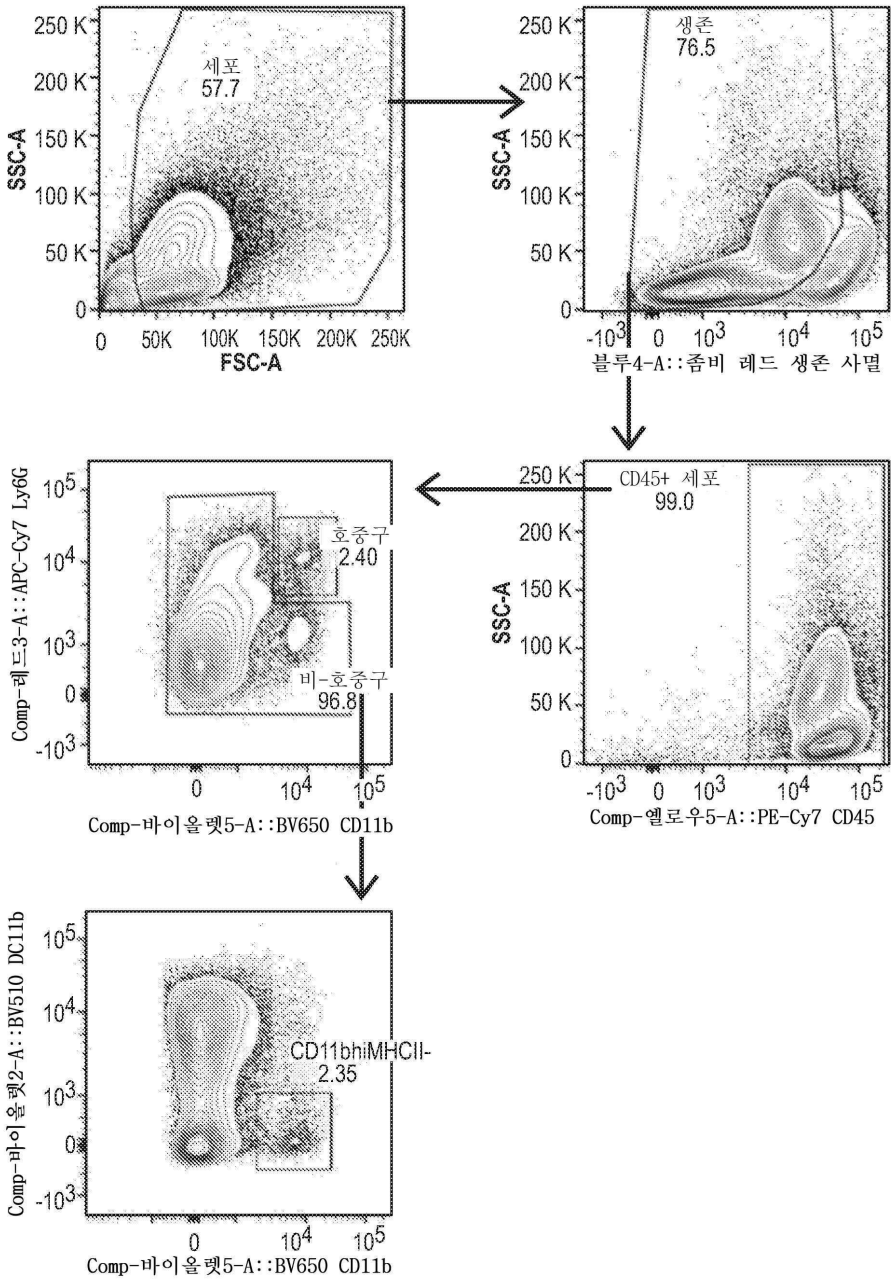
도면34a


세포
57.7
SSC-A
FSC-A
생존
76.5
블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
CD45+ 세포
99.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
호중구
2.40
비-호중구
96.8
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bhiMHCII-
2.35
Comp-바이올렛2-A::BV510 DC11b
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b

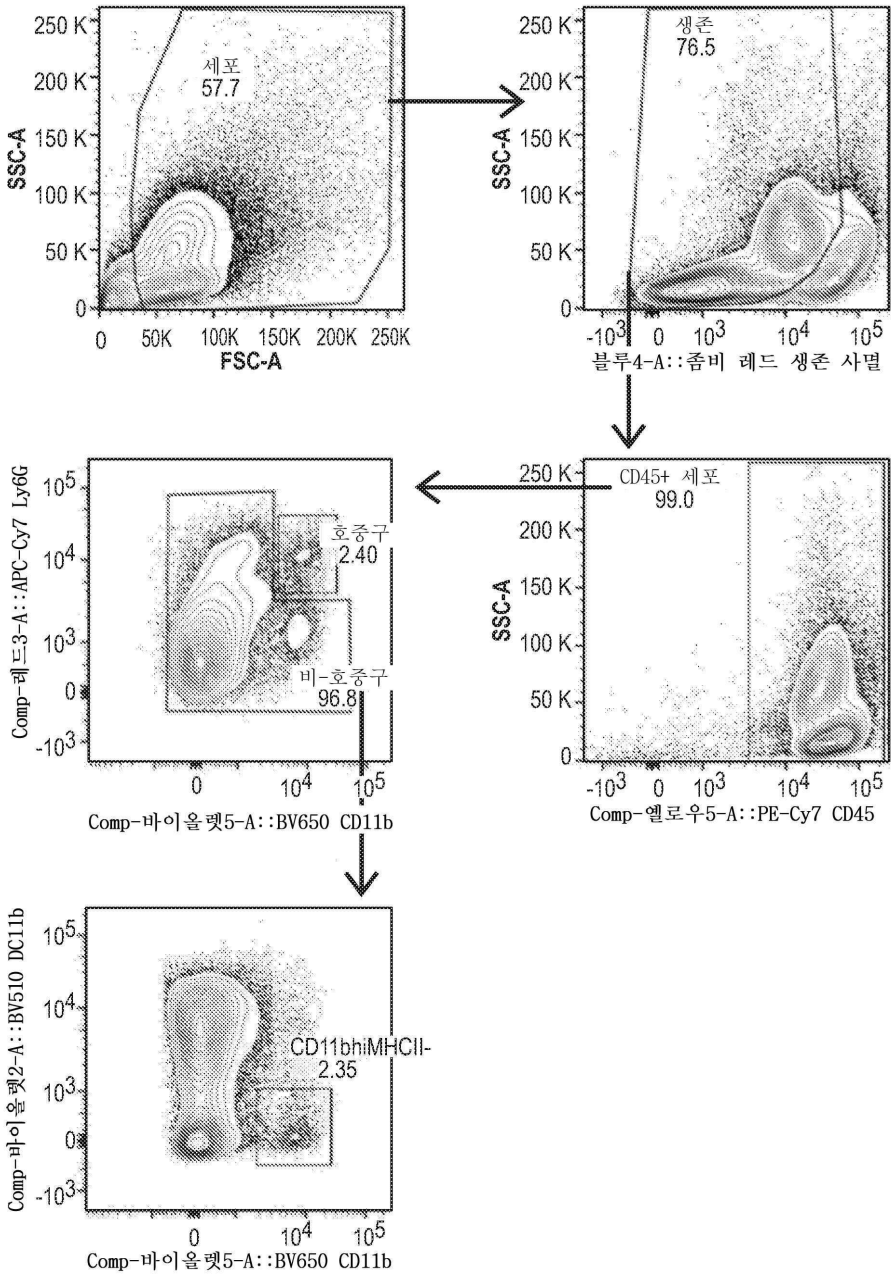
도면34b


세포
57.7
SSC-A
FSC-A
생존
76.5
블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
CD45+ 세포
99.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
호중구
2.40
비-호중구
96.8
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bhiMHCII-
2.35
Comp-바이올렛2-A::BV510 DC11b

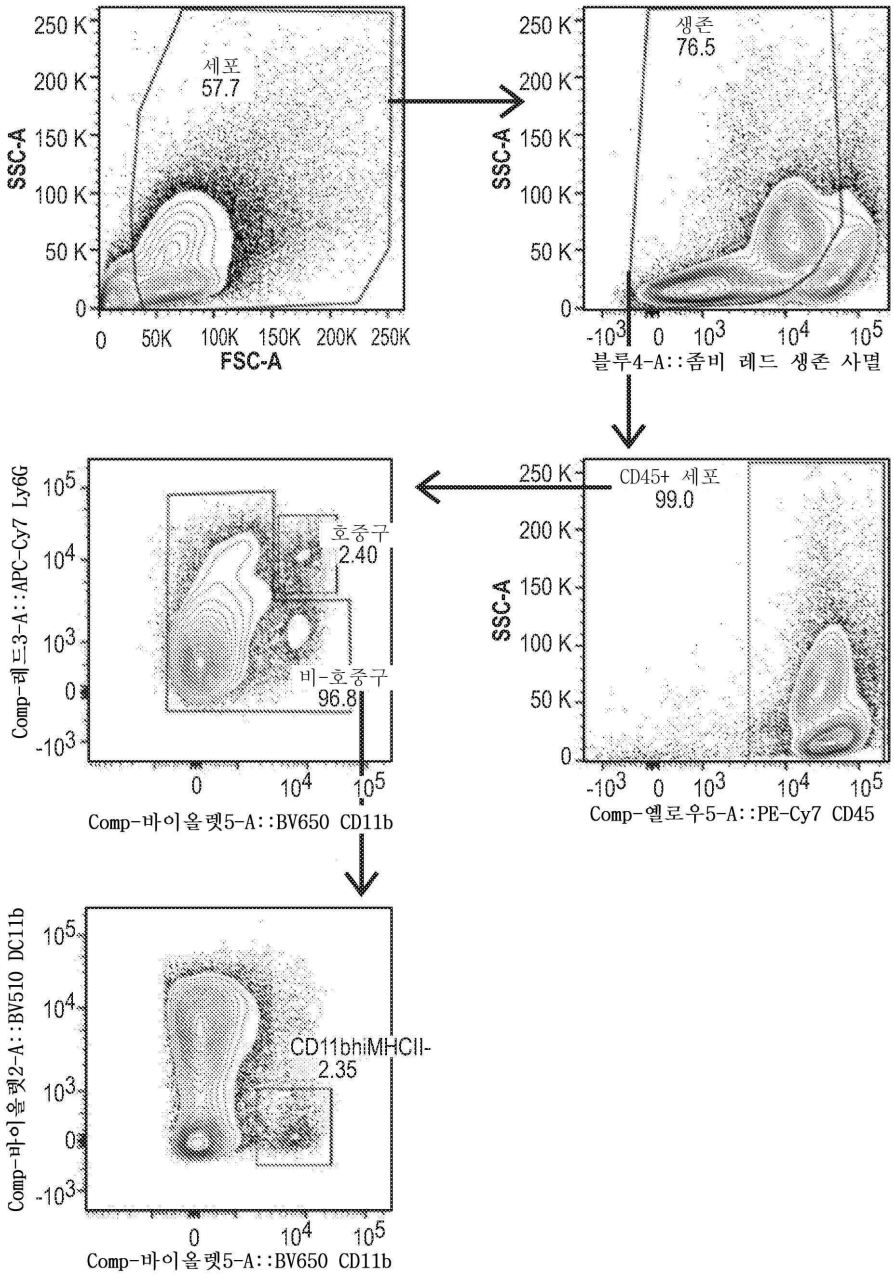
도면34c


세포
57.7
SSC-A
FSC-A
생존
76.5
블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
CD45+ 세포
99.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
호중구
2.40
비-호중구
96.8
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bhiMHCII-
2.35
Comp-바이올렛2-A::BV510 DC11b
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b

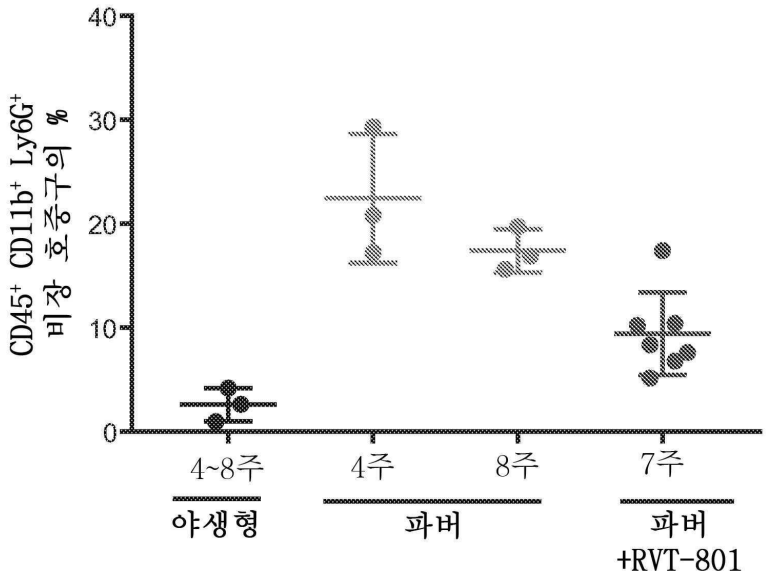
도면34d


세포
57.7
SSC-A
FSC-A
생존
76.5
블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
CD45+ 세포
99.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
호중구
2.40
비-호중구
96.8
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bhiMHCII-
2.35
Comp-바이올렛2-A::BV510 DC11b
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b

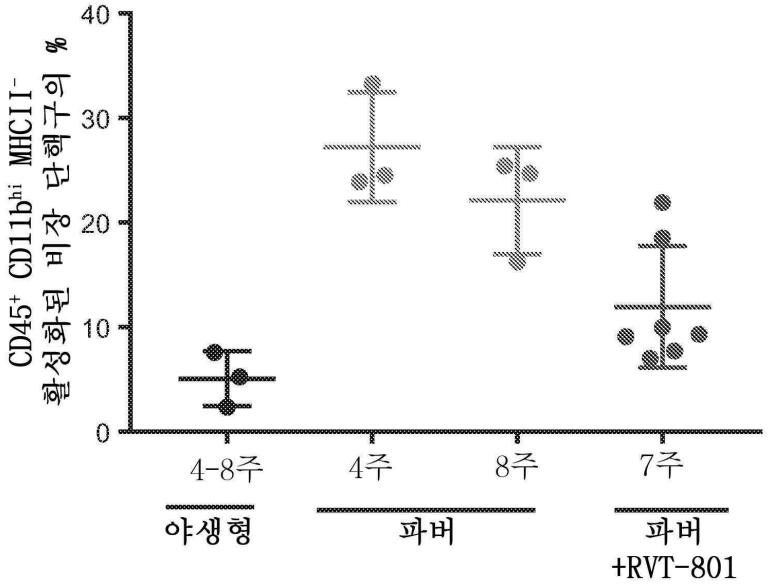
도면34e


세포
57.7
SSC-A
FSC-A
생존
76.5
블루4-A::좀비 레드 생존 사멸
CD45+ 세포
99.0
Comp-엘로우5-A::PE-Cy7 CD45
호중구
2.40
비-호중구
96.8
Comp-레드3-A::APC-Cy7 Ly6G
Comp-바이올렛5-A::BV650 CD11b
CD11bhiMHCII-
2.35
Comp-바이올렛2-A::BV510 DC11b

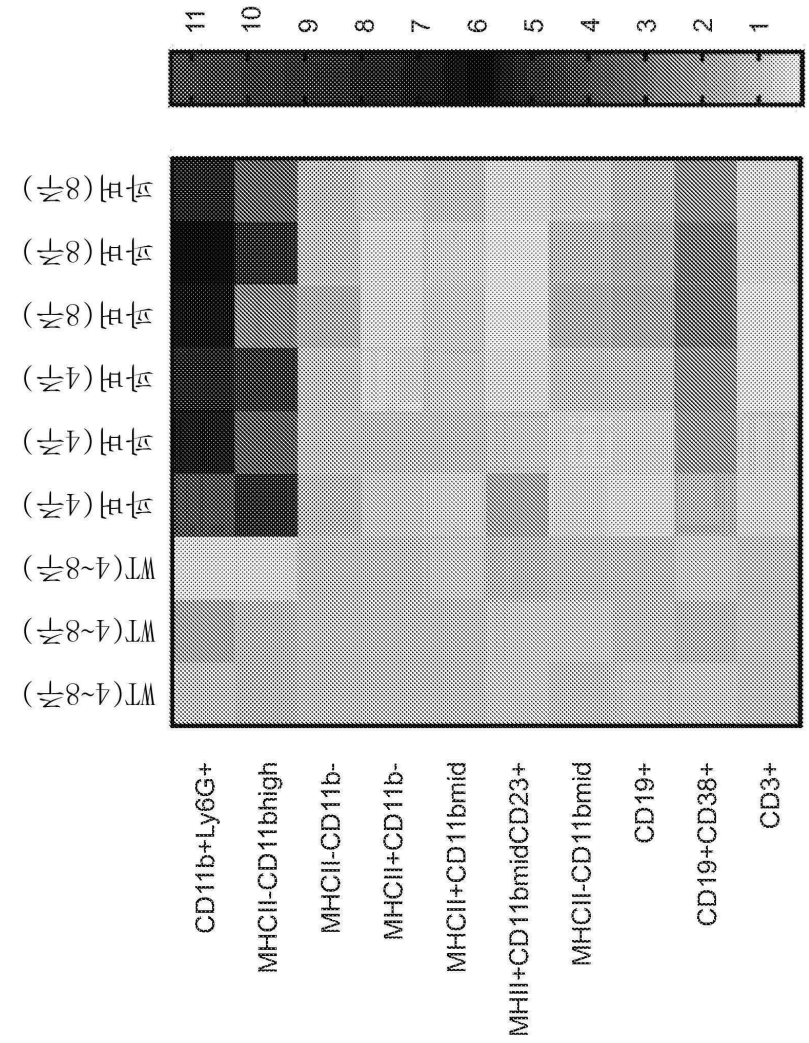
도면35a


CD45+ CD11b+ Ly6G+
비장 호중구의 %
40
30
20
10
0
4~8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버
+RVT-801

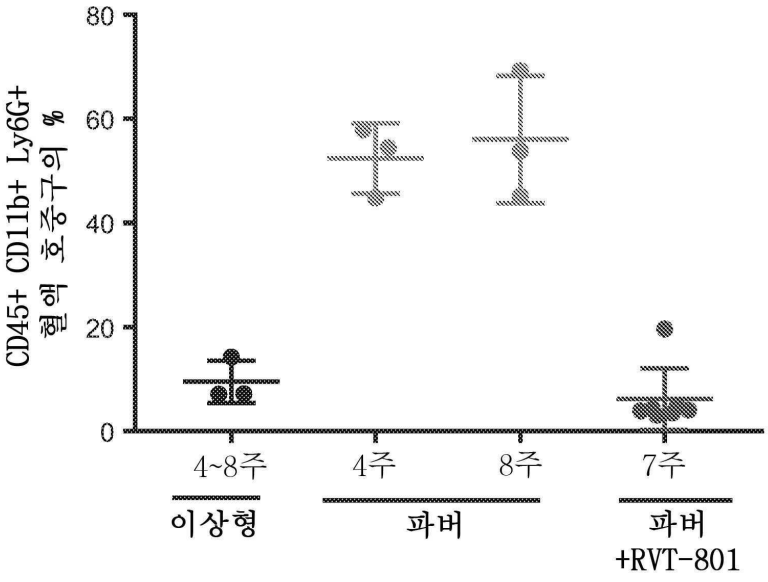
도면35b


CD45+ CD11bhi MHCII-
활성화된 비장 단핵구의 %
40
30
20
10
0
4-8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버
+RVT-801

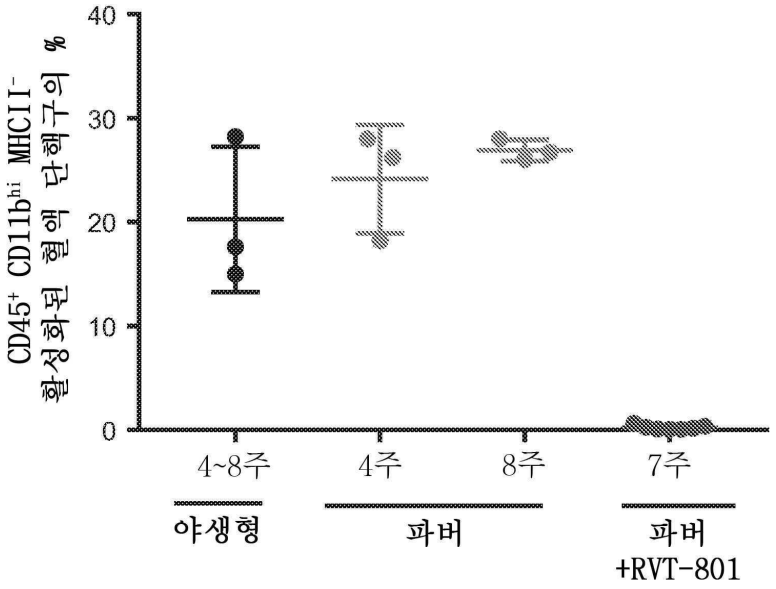
도면35c


11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
파버(8주)
파버(8주)
파버(8주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(4주)
WT(4~8주)
WT(4~8주)
WT(4~8주)
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11bhigh
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11bmid
MHII+CD11bmidCD23+
MHCII-CD11bmid
CD19+
CD19+CD38+
CD3+

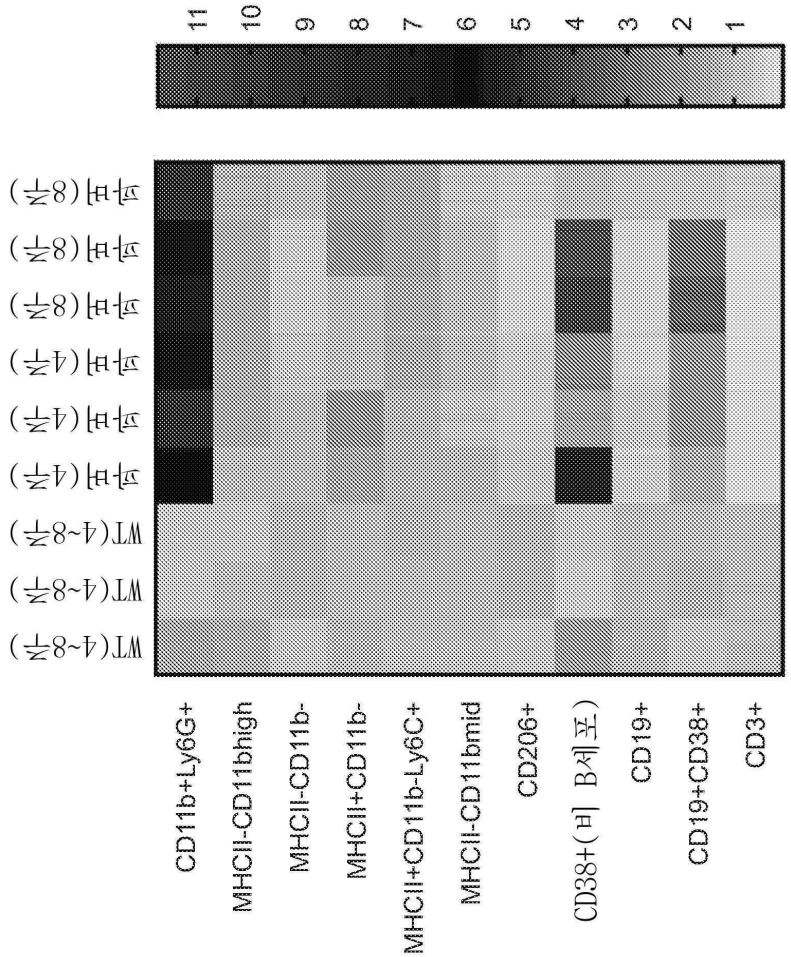
도면36a


CD45+ CD11b+ Ly6G+
혈액 호중구의 %
80
60
40
20
0
4~8주
4주
8주
7주
이상형
파버
파버
+RVT-801

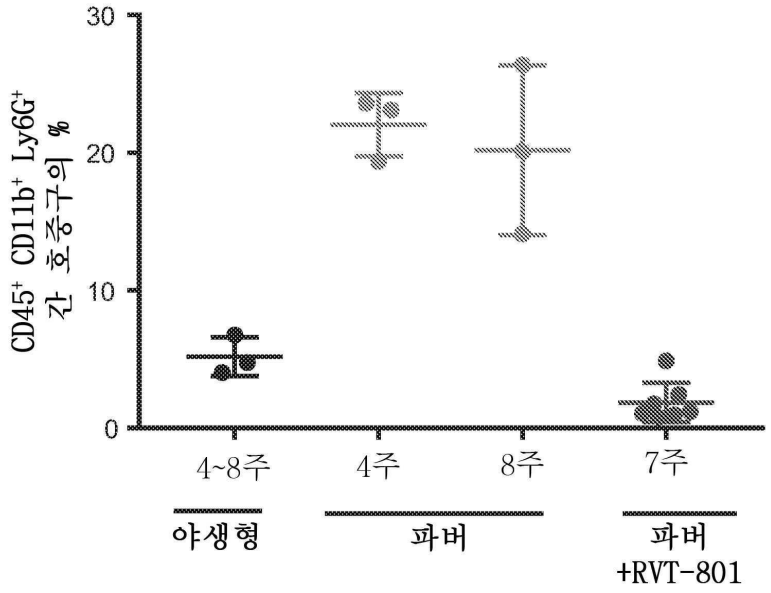
도면36b


CD45+ CD11bhi MHCII- 활성화된 혈액 단핵구의 %
40
30
20
10
0
4~8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버 +RVT-801

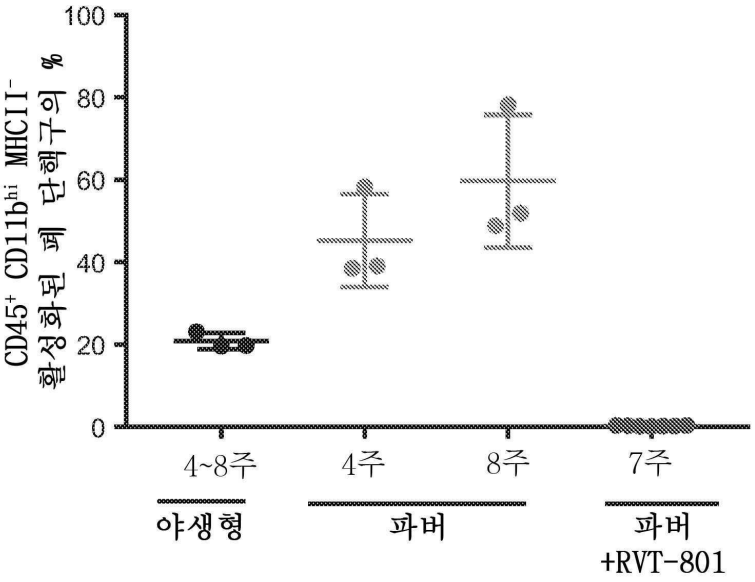
도면36c


11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
파버(8주)
파버(8주)
파버(8주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(4주)
WT(4~8주)
WT(4~8주)
WT(4~8주)
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11bhigh
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11b-Ly6C+
MHCII-CD11bmid
CD206+
CD38+(비 B세포)
CD19+
CD19+CD38+
CD3+

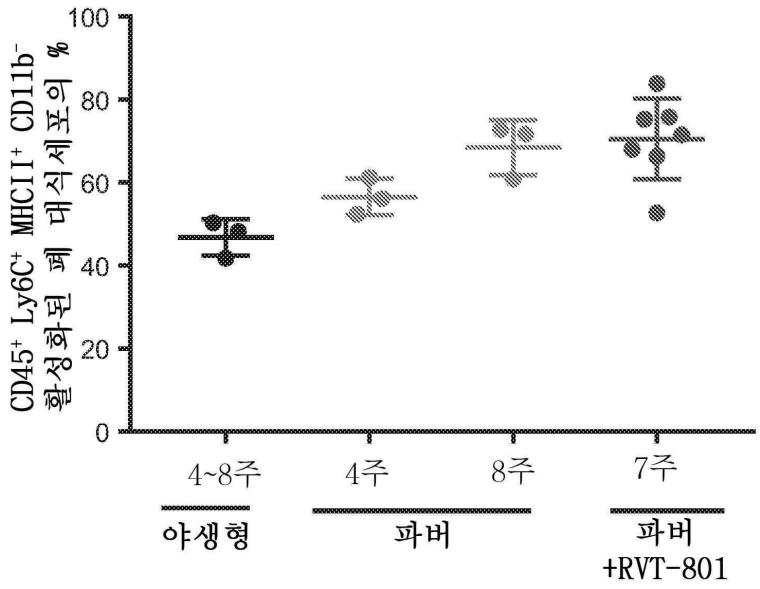
도면37a


CD45+ CD11b+ Ly6G+
간 호중구의 %
30
20
10
0
4~8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버
+RVT-801

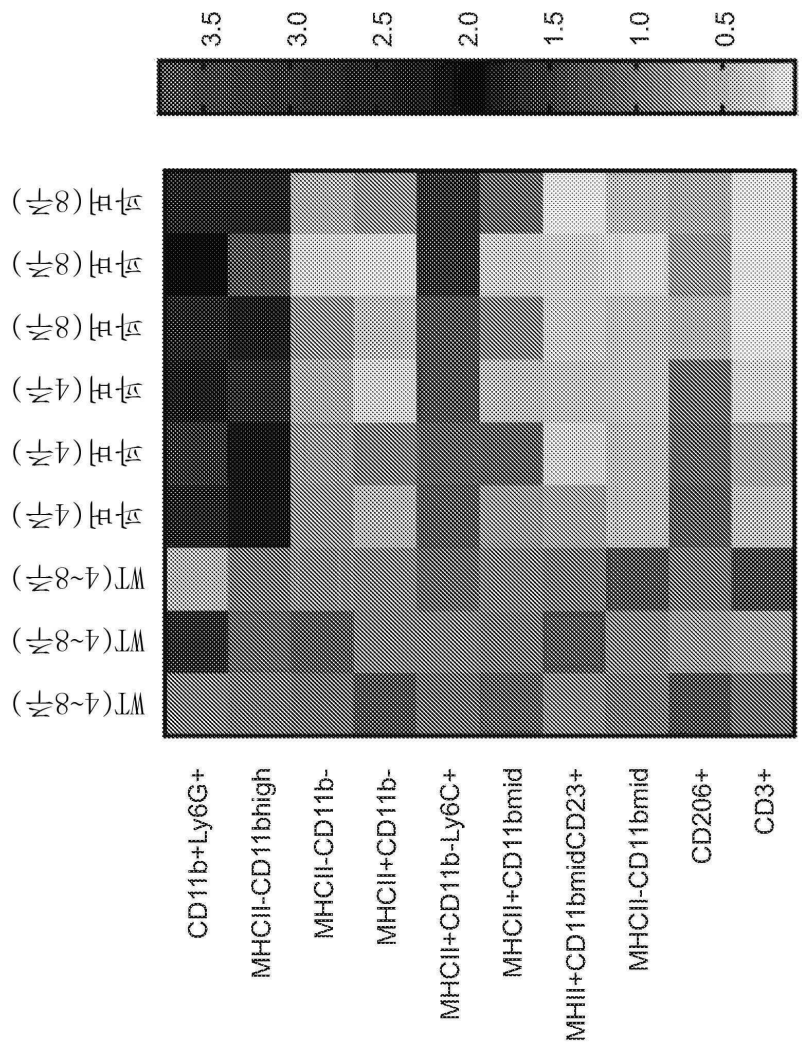
도면37b


CD45+ CD11bhi MHCII-
활성화된 폐 단핵구의 %
100
80
60
40
20
0
4~8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버
+RVT-801

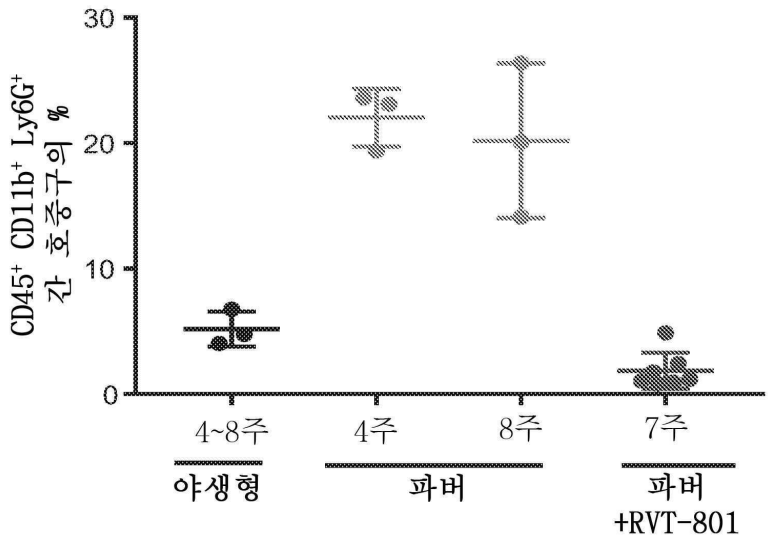
도면37c


CD45+ Ly6C+ MHCII+ CD11b-
활성화된 폐 대식세포의 %
100
80
60
40
20
0
4~8주
4주
8주
7주
야생형
파버
파버
+RVT-801

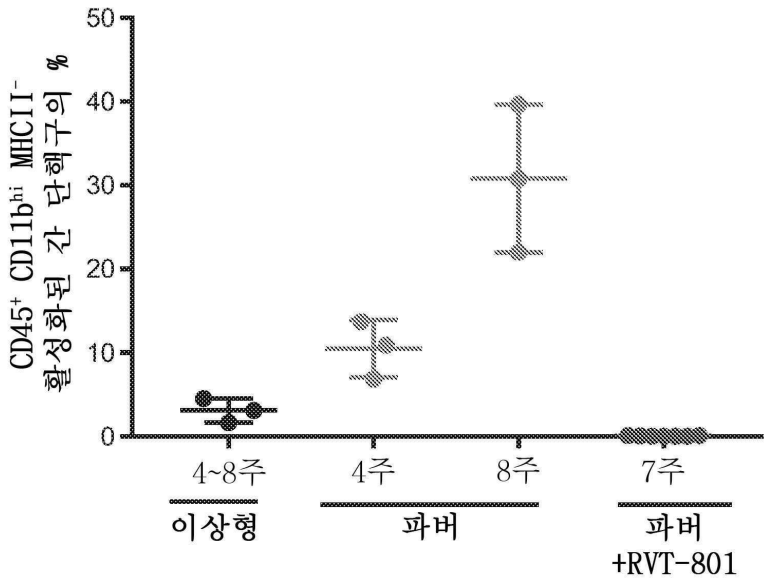
도면37d


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
WT(4~8주)
WT(4~8주)
WT(4~8주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(4주)
파버(8주)
파버(8주)
파버(8주)
CD11b+Ly6G+
MHCII-CD11bhigh
MHCII-CD11b-
MHCII+CD11b-
MHCII+CD11b-Ly6C+
MHCII+CD11bmid
MHII+CD11bmidCD23+
MHCII-CD11bmid
CD206+
CD3+

도면38a



도면38b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ENZYVANT THERAPEUTICS GMBH

<120> FARBER DISEASE MARKERS AND USES THEREOF

<130> IPA200704-US-D1-1

<140><141><150> US 62/648,775

<151> 2018-03-27

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 395

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220><223> Recombinant human acid ceramidase

<400> 1

Met Pro Gly Arg Ser Cys Val Ala Leu Val Leu Leu Ala Ala Ala Val
1 5 10 15

Ser Cys Ala Val Ala Gln His Ala Pro Pro Trp Thr Glu Asp Cys Arg
20 25 30

Lys Ser Thr Tyr Pro Pro Ser Gly Pro Thr Tyr Arg Gly Ala Val Pro
35 40 45

Trp Tyr Thr Ile Asn Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Lys Arg Trp His Glu
50 55 60

Leu Met Leu Asp Lys Ala Pro Val Leu Lys Val Ile Val Asn Ser Leu
65 70 75 80

Lys Asn Met Ile Asn Thr Phe Val Pro Ser Gly Lys Ile Met Gln Val
85 90 95

Val Asp Glu Lys Leu Pro Gly Leu Leu Gly Asn Phe Pro Gly Pro Phe
100 105 110

Glu Glu Glu Met Lys Gly Ile Ala Ala Val Thr Asp Ile Pro Leu Gly
115 120 125

Glu Ile Ile Ser Phe Asn Ile Phe Tyr Glu Leu Phe Thr Ile Cys Thr
130 135 140

Ser Ile Val Ala Glu Asp Lys Lys Gly His Leu Ile His Gly Arg Asn
145 150 155 160

Met Asp Phe Gly Val Phe Leu Gly Trp Asn Ile Asn Asn Asp Thr Trp
165 170 175

Val Ile Thr Glu Gln Leu Lys Pro Leu Thr Val Asn Leu Asp Phe Gln
180 185 190

Arg Asn Asn Lys Thr Val Phe Lys Ala Ser Ser Phe Ala Gly Tyr Val
195 200 205

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

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

Ala Lys Met Cys Leu Asn Arg Thr Ser Gln Glu Asn Ile Ser Phe Glu
340 345 350
Thr Met Tyr Asp Val Leu Ser Thr Lys Pro Val Leu Asn Lys Leu Thr
355 360 365
Val Tyr Thr Thr Leu Ile Asp Val Thr Lys Gly Gln Phe Glu Thr Tyr
370 375 380
Leu Arg Asp Cys Pro Asp Pro Cys Ile Gly Trp
385 390 395
<210> 2
<211> 2618

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><223> Encodes recombinant human acid ceramidase

<400> 2

ggctcggtcc gactattgcc cgcggtgggg gaggggggatg gatcacgcca cgcgccaaag 60

gcgatcgcga ctctccttct gcaggtagcc tggaaggctc tctctctttc tctacgccac 120

ccttttcgtg gcactgaaaa gccccgtcct ctcctcccag tcccgcctcc tccgagcgtt 180

ccccctactg cctggaatgg tgcggtccca ggtcgcgggt cacgcggcgg agggggcgtg 240

gcctgccccc ggcccagccg gctcttcttt gcctctgctg gagtccgggg agtggcgttg 300

gctgctagag cgatgccggg ccggagttgc gtcgccttag tcctcctggc tgccgccgtc 360

agctgtgccg tcgcgcagca cgcgccgccg tggacagagg actgcagaaa atcaacctat 420

cctccttcag gaccaacgta cagaggtgca gttccatggt acaccataaa tcttgactta 480

ccaccctaca aaagatggca tgaattgatg cttgacaagg caccagtgct aaaggttata 540

gtgaattctc tgaagaatat gataaataca ttcgtgccaa gtggaaaaat tatgcaggtg 600

gtggatgaaa aattgcctgg cctacttggc aactttcctg gccctttga agaggaaatg 660

aagggtattg ccgctgttac tgatatacct ttaggagaga ttatttcatt caatattttt 720

tatgaattat ttaccatttg tacttcaata gtagcagaag acaaaaaagg tcatctaata 780

catgggagaa acatggattt tggagtattt cttgggtgga acataaataa tgatacctgg 840

gtcataactg agcaactaaa acctttaaca gtgaatttgg atttccaaag aaacaacaaa 900

actgtcttca aggcttcaag ctttgctggc tatgtgggca tgttaacagg attcaaacca 960

ggactgttca gtcttacact gaatgaacgt ttcagtataa atggtggtta tctgggtatt 1020

ctagaatgga ttctgggaaa gaaagatgtc atgtggatag ggttcctcac tagaacagtt 1080

ctggaaaata gcacaagtta tgaagaagcc aagaatttat tgaccaagac caagatattg 1140

gccccagcct actttatcct gggaggcaac cagtctgggg aaggttgtgt gattacacga 1200

gacagaaagg aatcattgga tgtatatgaa ctcgatgcta agcagggtag atggtatgtg 1260

gtacaaacaa attatgaccg ttggaaacat cccttcttcc ttgatgatcg cagaacgcct 1320

gcaaagatgt gtctgaaccg caccagccaa gagaatatct catttgaaac catgtatgat 1380

gtcctgtcaa caaaacctgt cctcaacaag ctgaccgtat acacaacctt gatagatgtt 1440

accaaaggtc aattcgaaac ttacctgcgg gactgccctg acccttgtat aggttggtga 1500

gcacacgtct ggcctacaga atgcggcctc tgagacatga agacaccatc tccatgtgac 1560

cgaacactgc agctgtctga ccttccaaag actaagactc gcggcaggtt ctctttgagt 1620

caatagcttg tcttcgtcca tctgttgaca aatgacagat ctttttttttt tccccctatc 1680

agttgatttt tcttatttac agataacttc tttaggggaa gtaaaacagt catctagaat 1740

tcactgagtt ttgtttcact ttgacatttg gggatctggt gggcagtcga accatggtga 1800

actccacctc cgtggaataa atggagattc agcgtgggtg ttgaatccag cacgtctgtg 1860

tgagtaacgg gacagtaaac actccacatt cttcagtttt tcacttctac ctacatattt 1920

gtatgttttt ctgtataaca gccttttcct tctggttcta actgctgtta aaattaatat 1980

atcattatct ttgctgttat tgacagcgat ataattttat tacatatgat tagagggatg 2040

agacagacat tcacctgtat atttctttta atgggcacaa aatgggccct tgcctctaaa 2100

tagcactttt tggggttcaa gaagtaatca gtatgcaaag caatctttta tacaataatt 2160

gaagtgttcc ctttttcata attactctac ttcccagtaa ccctaaggaa gttgctaact 2220

taaaaaactg catcccacgt tctgttaatt tagtaaataa acaagtcaaa gacttgtgga 2280

aaataggaag tgaacccata ttttaaattc tcataagtag cattcatgta ataaacaggt 2340

ttttagtttg ttcttcagat tgatagggag ttttaaagaa attttagtag ttactaaaat 2400

tatgttactg tatttttcag aaatcaaact gcttatgaaa agtactaata gaacttgtta 2460

acctttctaa ccttcacgat taactgtgaa atgtacgtca tttgtgcaag accgtttgtc 2520

cacttcattt tgtataatca cagttgtgtt cctgacactc aataaacagt cactggaaag 2580

agtgccagtc agcagtcatg cacgctgatt gggtgtgt 2618

<210> 3

<211> 1276

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<220><223> Encodes recombinant human acid ceramidase

<400>

3

aagcttaccg ccaccatgaa ctgctgcatc ggcctgggtg agaaggcgcg tggctcgcac 60

cgcgccagct acccctccct gagcgccctc ttcaccgagg cgtccatcct cggattcggg 120

agcttcgccg tcaaggcaca gtggaccgag gattgccgca agagtacgta ccccccccagt 180

ggcccgacgt accgcggcgc cgtcccctgg tacacgatca acctggacct ccccccgtac 240

aagcgctggc acgagttgat gctggacaag gcccccgtac tgaaggtcat cgtgaactcc 300

ctgaagaaca tgatcaacac cttcgtcccc tcgggcaaga tcatgcaggt cgtggacgag 360

aagctgcccg ggctcctcgg caacttcccc ggcccgttcg aagaggagat gaagggcatc 420

gcggccgtca ctgacatccc cctgggcgag atcatcagct tcaacatctt ctacgagctg 480

ttcaccatct gcacctccat cgtagccgag gacaagaagg gccacctgat ccacggtcgc 540

aacatggact tcggcgtctt cctgggctgg aacatcaaca acgacacctg ggtcatcacc 600

gagcagctga agccgctcac cgtgaacctc gatttccagc gcaacaacaa gacggtgttc 660

aaggccagct ccttcgccgg gtacgtcggg atgctcacgg gcttcaagcc gggactgttc 720

tcgctgaccc tcaacgagcg gttctccatc aacgggggct acctcggcat cctggagtgg 780

attctcggca agaaggacgt gatgtggatc ggcttcctca cacggaccgt gctggaaaac 840

tccactagtt acgaggaggc caagaacctg ctgaccaaga cgaagatcct ggccccggca 900

tacttcatcc tgggcggcaa ccagtcgggc gaggggtgcg tcatcacccg cgaccggaag 960

gagtccctgg acgtctatga gctggacgcc aagcagggcc gctggtacgt cgtccagacg 1020

aactacgacc gatggaagca ccccttcttc ctcgacgacc ggcgcacgcc cgccaagatg 1080

tgcctgaacc gcaccagcca ggagaacatc tcgttcgaga cgatgtacga cgtgctgtcg 1140

accaagcccg tgctcaacaa gctgacggtc tacaccacgc tgatcgacgt gacgaaaggc 1200

cagttcgaaa cgtacctgcg ggactgcccg gacccttgca tcggctggtg ataatctaga 1260

gtcggggcgg ccggcc 1276

<210> 4

<211> 1276

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<220><223> Encodes recombinant human acid ceramidase

<400> 4

aagcttaccg ccaccatgaa ctgctgcatc gggctgggag agaaagctcg cgggtcccac 60

cgggcctcct acccaagtct cagcgcgctt ttcaccgagg cctcaattct gggatttggc 120

agctttgctg tgaaagccca atggacagag gactgcagaa aatcaaccta tcctccttca 180

ggaccaacgt acagaggtgc agttccatgg tacaccataa atcttgactt accaccctac 240

aaaagatggc atgaattgat gcttgacaag gcaccagtgc taaaggttat agtgaattct 300

ctgaagaata tgataaatac attcgtgcca agtggaaaaa ttatgcaggt ggtggatgaa 360

aaattgcctg gcctacttgg caactttcct ggccctttg aagaggaaat gaagggtatt 420

gccgctgtta ctgatatacc tttaggagag attatttcat tcaatatttt ttatgaatta 480

tttaccattt gtacttcaat agtagcagaa gacaaaaaag gtcatctaat acatgggaga 540

aacatggatt ttggagtatt tcttgggtgg aacataaata atgatacctg ggtcataact 600

gagcaactaa aacctttaac agtgaatttg gatttccaaa gaaacaacaa aactgtcttc 660

aaggcttcca gctttgctgg ctatgtgggc atgttaacag gattcaaacc aggactgttc 720

agtcttacac tgaatgaacg tttcagtata aatggtggtt atctgggtat tctagaatgg 780

attctgggaa agaaagatgt catgtggata gggttcctca ctagaacagt tctggaaaat 840

agcacaagtt atgaagaagc caagaattta ttgaccaaga ccaagatatt ggccccagcc 900

tactttatcc tgggaggcaa ccagtctggg gaaggttgtg tgattacacg agacagaaag 960

gaatcattgg atgtatatga actcgatgct aagcagggta gatggtatgt ggtacaaaca 1020

aattatgacc gttggaaaca tcccttcttc cttgatgatc gcagaacgcc tgcaaagatg 1080

tgtctgaacc gcaccagcca agagaatatc tcatttgaaa ccatgtatga tgtcctgtca 1140

acaaaacctg tcctcaacaa gctgaccgta tacacaacct tgatagatgt taccaaaggt 1200

caattcgaaa cttacctgcg ggactgccct gacccttgta taggttggtg ataacctagg 1260

gtcggggcgg ccggcc 1276