



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0108519  
(43) 공개일자 2014년09월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/24 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)  
C12N 15/09 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01)  
A61P 37/06 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7012617  
(22) 출원일자(국제) 2012년10월11일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2014년05월09일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/059708  
(87) 국제공개번호 WO 2013/055888  
국제공개일자 2013년04월18일  
(30) 우선권주장  
61/546,248 2011년10월12일 미국(US)

(71) 출원인  
시나게바 바이오파르마, 코포레이션  
미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 하이든 애비뉴 33  
(72) 발명자  
퀸, 안토니  
미국 매사추세츠주 02467 체스넛 힐 마넛 로드 107  
레빗, 마클리, 씨.  
미국 조지아주 30677 왓킨스빌 래섬 드라이브 1140  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인아주양현

전체 청구항 수 : 총 88 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 인간 NaGlu 단백질 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 재조합 인간 NaGlu 단백질의 단리 혼합물을 포함하는 조성물로서, 혼합물 내의 실질적인 양의 NaGlu 단백질이 인간 세포로 효과적으로 내재화되는 단백질을 부여하는 인산화 만노스의 수치 증가를 갖는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 NaGlu 단백질의 이러한 혼합물, 형질전환 및 발현에서 사용되는 벡터, 이러한 벡터를 보유하는 숙주 세포의 생성 방법, 및 NaGlu 단백질의 혼합물을 단리하고 정제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 추가로 NaGlu 관련 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1

인간 NaGlu 아미노산 서열(신호 펩타이드: 1-23번, 밑줄침)

```

MEAVAVAAAV GVLLLAGAGG AAGDEAREAA AVRALVARLL GPGPAADFSV SVERALAACP      60
GLDTYSLGGG GAARVRVRGS TGVAAGAGLH RYLRFDFGCH VAWSGSQLRL PRPLPAVPGE      120
LTEATPNRYR YYQNVCTQSY SFVWWDWARW EREIDWMLN GINLALAWSG QEATWQRVYL      180
ALGLTQAEIN EFFTGPAPLA WGRMGNLHTW DGPLPPSWHI KQLYLQHRVL DQMRSPGMT      240
VLPAPAGHVP EAVTRVFPQV NVTKMGSGWH FNCSYSGSFL LAPEDPIFPI IGSLFLRELI      300
KEFGTDHIYG ADTFNEMQPP SSEPSYLAAA TTAVYEAMTA VDEAVWLLQ GWLFQHQPFQ      360
WGPAQIRAVL GAVPRGRLLV LDLFASQPV YTRTASFQGG PFIWCMLHNF GGNHGLFGAL      420
EAVNGGPEAA RLFPNSTMVG TGMAPEGISQ NEVVYSLMAE LGWRKDPVPD LAAWVTSFAA      480
RRYGVSHFDA GAAWRLLLRS VYNCSEACR GHNRSPVLR PSLQMNNTSIW YNRSDVFEAW      540
RLLLTSAFSL ATSPAFRYDL LDLTRQAVQE LVSLYYEEAR SAYLSKELAS LLRAGGVLAY      600
ELLPALDEVL ASDSRFLGSL WLEQARAAAV SEAEADFYEQ NSRYQLTLWG PEGNILDYAN      660
KQLAGLVANY YTPRWRLFLE ALVDSVAQGI PFQQHQFDKN VFQLEQAFVL SKQRYPSQPR      720
GDTVDLAKKI FLKYYPRWVA GSW
    
```

(서열 번호 1)

(72) 발명자

**지난, 시아**

미국 매사추세츠주 02481 웰즐리 버크 레인 29

**르코우스키, 조셉, 빅터**

미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 스위트 520 스프링 스트리트 128 시나게바 바이오파르마, 코포레이션 내

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열을 포함하는 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제 (recombinant human N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase: rhNaGlu)의 단리 혼합물을 포함하는 조성물로서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 10%는 만노스-6-포스페이트(mannose-6-phosphate: M6P)를 갖는 적어도 1 개의 글라이칸 구조를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 M6P를 갖는 rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 포유동물 세포로 채워져 내재화된 rhNaGlu는 동일한 유형의 야생형 포유동물 세포에서 관찰된 정상 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구할 수 있는 것인 조성물.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 글라이칸 구조는 N-연결 글라이칸인 것인 조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 적어도 1몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 1 내지 약 6몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 2몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 3몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 4몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 9

제5항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 5몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 10

제5항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 6몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

### 청구항 11

제2항에 있어서, 상기 NaGlu가 결핍된 포유동물 세포는 인간 세포인 것인 조성물.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 NaGlu가 결핍된 인간 세포는 피부 섬유아세포, 간세포 또는 대식세포인 것인 조성물.

### 청구항 13

제11항에 있어서, 상기 NaGlu가 결핍된 인간 세포는 신경 세포인 것인 조성물.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는

것인 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 척추강내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

#### 청구항 17

제2항에 있어서, 상기 M6P를 갖는 rhNaGlu는 NaGlu 결핍 세포에 의해 내재화되고 생체내 정상 NaGlu 활성 중 적어도 100%를 복구하는 것인 조성물.

#### 청구항 18

제2항에 있어서, 상기 M6P를 갖는 rhNaGlu는 단백질 1몰당 적어도 25몰의 만노스를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 19

제1항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%는 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 20%는 적어도 1종의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 30%는 적어도 1종의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 40%는 적어도 1종의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 50%는 적어도 1종의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 혼합물 내의 상기 rhNaGlu 중 적어도 60%는 적어도 1종의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 25

서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열을 포함하는 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(rhNaGlu)의 단리 혼합물을 포함하는 조성물로서, 상기 혼합물은 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는 1개 이상의 글라이칸 구조를 포함하는 충분한 양의 rhNaGlu를 포함하여 상기 M6P를 포함하는 rhNaGlu는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물 세포로 내재화되고 내인성 NaGlu를 발현하는 동일한 유형의 야생형 세포에서 관찰된 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구하는 것인 조성물.

#### 청구항 26

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 N-연결 글라이코실화된 것인 조성물.

#### 청구항 27

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 O-연결 글라이코실화된 것인 조성물.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 적어도 1몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 3몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 4몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 32**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 만노스를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 33**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 34**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 갈락토스를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 35**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함하는 것인 조성물.

**청구항 36**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 푸코스를 포함하지 않는 것인 조성물.

**청구항 37**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 글루코스를 포함하지 않는 것인 조성물.

**청구항 38**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 정상 NaGlu 효소 활성 중 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 100%를 복구하는 것인 조성물.

**청구항 39**

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

**청구항 41**

제25항에 있어서, 상기 NaGlu가 결핍된 포유동물 세포는 인간 세포인 것인 조성물.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 인간 세포는 피부 섬유아세포, 간세포 또는 대식세포인 것인 조성물.

#### 청구항 43

제41항에 있어서, 상기 NaGlu가 결핍된 인간 세포는 신경 세포인 것인 조성물.

#### 청구항 44

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 제2 모이어티를 포함하는 융합 단백질인 것인 조성물.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 상기 제2 모이어티는 폴리펩타이드인 것인 조성물.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 트랜스페린 수용체 리간드(transferrin receptor ligand: TfRL), 인슐린양 성장 인자 수용체(insulin-like growth factor receptor: IGF2R) 리간드, 저밀도 지방단백질(low density lipoprotein: LDL) 수용체 리간드 및 산성 아미노산(acidic amino acid: AAA) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

#### 청구항 47

제25항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 형질전환 조류로부터 생성되는 것인 조성물.

#### 청구항 48

제47항에 있어서, 상기 형질전환 조류는 닭, 칠면조, 오리 또는 메추라기인 것인 조성물.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 상기 형질전환 조류는 닭인 것인 조성물.

#### 청구항 50

제49항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 나팔관 세포로부터 생성되는 것인 조성물.

#### 청구항 51

충분한 양의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 갖는 1개 이상의 글라이칸 구조를 포함하는 단리된 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(rhNaGlu)를 포함하는 조성물로서, M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물 세포 내로 상기 rhNaGlu를 내재화시켜, 상기 rhNaGlu가, 생체내 내재화될 때, 정상 피험체에서 동일한 유형의 세포에서 관찰된 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구시키는 것인 조성물.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 rhNaGlu 단백질은 N-연결 글라이코실화된 것인 조성물.

#### 청구항 53

제51항에 있어서, 상기 rhNaGlu 단백질은 O-연결 글라이코실화된 것인 조성물.

#### 청구항 54

제51항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 M6P를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 55

제51항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

#### 청구항 56

제55항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는

것인 조성물.

#### 청구항 57

제51항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 척추강내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달되는 것인 조성물.

#### 청구항 58

제조합 인간 NaGlu(rhNaGlu)를 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류로서, 상기 전이유전자는 상기 형질전환 조류의 계놈에 포함되고 나팔관 세포에서 발현되어, 상기 rhNaGlu가 상기 형질전환 조류의 나팔관 세포에서 글라이코실화되고 나팔관의 자궁강(lumen)으로 분비되며 상기 형질전환 조류의 알(egg)의 난백에 침착된 것인 형질전환 조류.

#### 청구항 59

제58항에 있어서, 상기 rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 2, 3, 4 또는 6몰의 M6P를 포함하는 것인 형질전환 조류.

#### 청구항 60

제58항에 있어서, 상기 프로모터 성분은 나팔관 특이적 프로모터인 것인 형질전환 조류.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, 상기 나팔관 특이적 프로모터는 오브알부민 프로모터인 것인 형질전환 조류.

#### 청구항 62

제58항에 있어서, 상기 형질전환 조류는 닭, 칠면조, 오리 및 메추라기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 형질전환 조류.

#### 청구항 63

제58항의 형질전환 조류에 의해 생산된 알(egg).

#### 청구항 64

제조합 인간 NaGlu(rhNaGlu)를 생성하는 방법으로서,

- 서열 번호 1의 24 내지 743번에 기재된 rhNaGlu를 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 성분을 갖는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류를 생성하는 단계; 및
- 상기 난백으로부터 상기 rhNaGlu를 분리시키는 단계를 포함하되,

상기 전이유전자는 상기 형질전환 조류의 계놈에 포함되고 나팔관 세포에서 발현되어, 상기 rhNaGlu가 상기 형질전환 조류의 나팔관 세포에서 글라이코실화되고 나팔관의 자궁강으로 분비되며 상기 형질전환 조류가 낳은 알의 난백에 침착된 것인 방법.

#### 청구항 65

제64항에 있어서, 상기 프로모터 성분은 나팔관 특이적 프로모터인 것인 방법.

#### 청구항 66

제65항에 있어서, 상기 나팔관 특이적 프로모터는 오브알부민 프로모터인 것인 방법.

#### 청구항 67

제64항에 있어서, 상기 조류는 닭, 칠면조, 오리 및 메추라기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, 상기 조류는 닭인 것인 방법.

#### 청구항 69

오브알부민 프로모터에 작동적으로 연결된 인간 NaGlu를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터.

#### 청구항 70

제69항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 71

서열 번호 4의 5232-10248번의 핵산 서열을 포함하는 단리 핵산.

#### 청구항 72

제1항에 따른 조성물과 함께 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 제제.

#### 청구항 73

정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 혈액 뇌 장벽을 횡단하는 재조합 인간 NaGlu 단백질을 포함하는 조성물.

#### 청구항 74

NaGlu 결핍증을 겪는 피험체를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 치료학적 유효량의 제1항, 제25항 또는 제51항 중 어느 한 항의 조성물을 상기 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 75

NaGlu 결핍증을 겪는 피험체의 뇌에 재조합 인간 NaGlu 단백질을 전달하는 방법으로서, 상기 방법은 재조합 인간 NaGlu 단백질을 상기 피험체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 76

혈액 뇌 장벽을 거친 순환으로부터 재조합 인간 NaGlu 단백질을 치료학적 유효량으로 수송하는 방법으로서, 상기 방법은 재조합 인간 NaGlu 단백질을 NaGlu 결핍증을 앓는 피험체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NaGlu 결핍증은 B형 산필립포 증후군(Sanfilippo syndrome B)인 것인 방법.

#### 청구항 78

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 피험체는 인간인 것인 방법.

#### 청구항 79

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 약 1 내지 약 30mg/kg(체중)의 용량으로 상기 피험체에게 정맥내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 80

제79항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 약 6 내지 약 27mg/kg(체중)의 용량으로 상기 피험체에게 정맥내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 81

제74항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 상기 피험체에게 척추강내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 82



제81항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 적어도 약 0.3mg/kg(체중)의 용량으로 척추강내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 83

제82항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10mg/kg(체중)의 용량으로 척추강내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 84

제82항에 있어서, 상기 재조합 인간 NaGlu 단백질은 약 10 내지 약 30mg/kg(체중)의 용량으로 척추강내 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 85

제74항에 있어서, 상기 치료학적 유효량은 상기 피험체의 뇌, 신장 또는 간에서 황산헤파란 수치를 감소시키기에 효과적인 양인 것인 방법.

#### 청구항 86

제74항에 있어서, 상기 치료학적 유효량은 상기 피험체의 뇌 또는 간에서 NaGlu 활성을 증가시키기에 효과적인 양인 것인 방법.

#### 청구항 87

제74항에 있어서, 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 88

제87항에 있어서, 상기 제2 치료제는 면역억제제인 것인 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2011년 10월 12일자에 출원된 미국 가출원 제61/546,248호(이의 전체 내용은 참조문헌으로 본 명세서에 명확히 포함됨)에 관한 것으로, 이의 우선권을 주장한다.

#### 배경 기술

[0003] B형 산필립포 증후군(Sanfilippo syndrome B)은 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase: NaGlu)로 공지된 리소좀 효소 결핍으로 야기되는 상염색체 열성 리소좀 저장 질환(lysosomal storage disease: LSD)이다. NaGlu는 리소좀에서 글라이코사미노글라이칸(GAG)의 단계별 분해의 일부로서 황산헤파란 분해에 필요하다. NaGlu의 결핍 또는 부재는 황산헤파란을 축적시키고 노를 배설시킨다. 현재까지 확인된 70개 초과와 상이한 돌연변이로, B형 산필립포 증후군은 광범위한 분자 및 유전적 이질성을 나타낸다.

[0004] 200,000명의 출생자 중 대략 1명이 B형 산필립포 증후군을 갖고 결핍은 주로 유아에서 나타난다. 초기 무증상 생존 후, B형 산필립포 증후군을 앓는 환자는 보통 느린 정신 발달 및 행동 문제로 나타나고, 이후 중증 정신 지체, 치매 및 운동 질환을 발생시키는 지적 감퇴로 진행된다. 언어 습득이 느리고 불완전하다. 질환이 심한 환자는 빠르면 2세부터 심동 및 언어 발달 지연을 나타낼 수 있다. 질환은 보통 행동 장애 및 수면 장애 증가로 진행된다. 임상적 특징은 주로 신경학적이지만, 환자는 대개 설사, 부식 치아, 간 및 비장 확대, 뾰뚱한 관절, 갈증 및/또는 거친 모발로 진행하고 혈액 응고 문제를 나타낼 수 있다. 질환의 최종 병기에서, 환자는 움직일 수 없게 되고 비반응성이 되며 삼키기가 어렵고 발작으로 진행된다. 이환 어린이의 수명은 통상적으로 10대 후반 내지 20대 초반으로 연장되지 않는다.

[0005] 환자에서 분실 효소를 제공하는 상이한 접근법이 시도되었다. 효소 대체 치료(ERT)를 위해 NaGlu를 생성하기 위해, 다양한 포유동물 세포 배양계에서 인간 NaGlu가 발현되었다. 그러나, 세포내 리소좀으로 수송되는 천연

NaGlu와 반대로, 포유동물 세포로부터 생성되고 분비된 재조합 NaGlu 단백질은 오직 미량의 만노스 6-포스페이트(M6P)를 포함하거나 포함하지 않는 것으로 발견되었다. 분비된 NaGlu에서의 M6P 모이어티의 부재 또는 결핍은 이의 혈장 막 위의 표면에 M6P 수용체를 갖는 표적 세포(예를 들면, 인간 피부 섬유아세포)로의 이의 효과적인 내재화를 방지하는 것으로 알려져 있다(문헌[Zhao *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 19:202-211 (2000); 및 Weber *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 21:251-259 (2001)] 참조). CHO 세포에서 발현된 분비된 마우스 NaGlu, HeLa 세포에서 발현된 분비된 인간 NaGlu, 인간 섬유아세포에서 발현된 분비된 인간 NaGlu 및 인간 배아 신장(HEK) 세포주 293에서 발현된 분비된 인간 NaGlu에서 낮은 정도의 인산화가 관찰되었다(문헌[Zhao *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 19:202-211 (2000); Yogalingam *et al.*, *Biochim Biophys. Acta* 1502:415-425; 및 Weber *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 21:251-259 (2001)] 참조). 모든 상기 언급된 시도가, 어쨌든 검출 가능한 경우, 야생형 수치보다 거의 천배 적은 내재화된 단백질의 농도로서 표적 세포에 의해 효과적으로 채워지는 효소를 생성하지 못하므로, 포유동물 세포로부터 분비된 NaGlu 단백질에서의 N-글라이칸의 인산화가 약하거나 없다는 것은 효소 대체 치료에 적합한 재조합 인간 NaGlu 단백질의 개발에 대한 주요한 장애를 부여한다(문헌[Zhao *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 19:202-211 (2000)] 참조). 현재까지, B형 산필립포 증후군의 치료를 위해 이용 가능한 허가 제품이 없다.

[0006] NaGlu 결핍 마우스의 중추 신경계(CNS)로의 천연 아미노산 서열을 갖는 포유동물 세포 생성 재조합 인간 NaGlu 단백질(rhNaGlu)의 직접 투여(예를 들면, 뇌척수액(CSF)으로의 척추강내 투여)가 시도되었지만, 뇌실의 뇌실막에 단백질의 과도한 축적 및 효과적인 세포 흡수를 위한 필요한 M6P 잔기의 결여로 인해 뇌에 대한 효소의 성공적인 생체분포를 입증할 수 없다. 유사하게, 천연 아미노산 서열을 갖는 포유동물 세포 생성 rhNaGlu의 전신 투여(즉, 정맥내(IV) 주사)는 또한 뇌에 대한 단백질의 성공적인 국재화를 입증할 수 없다. 고침윤성 척추강내 투여와 관련된 공지된 위험 이외에, rhNaGlu를 뇌에 표적화하는 데 있어서 이러한 장애는 B형 산필립포 증후군의 치료를 위한 효과적인 치료를 성취하는 데 있어서 너무 큰 도전과제이다.

[0007] 따라서, 효소적으로 활성이고 단백질이 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단하게 하고 표적 세포의 리소솜으로 단백질을 효과적으로 내재화하기 위한 물리적 특성을 갖는 안정한 NaGlu 단백질을 제공할 필요가 존재한다. 혈액 뇌 장벽을 효과적으로 횡단하고 인간 표적 세포에 효과적으로 내재화된 재조합 인간 NaGlu를 제공할 수 있는 고발현이고 튼튼한 단백질 생성 플랫폼에 대한 필요가 또한 존재한다.

### 발명의 내용

[0008] 본 발명은 예를 들면 B형 산필립포 증후군의 치료에서 치료에 유용한 재조합 인간 NaGlu 단백질(rhNaGlu)을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 명세서에 기재된 rhNaGlu가 혈액 뇌 장벽(BBB)을 효과적으로 횡단하게 하고, 효소가 결핍된 동물의 중추 신경계(CNS) 내의 세포로 채워지는 1종 이상의 글라이코실화 패턴을 rhNaGlu가 가져, 뇌에서의  $\alpha$ -N-아세틸글루코사미니다제 활성을 극적으로 증가시키고 기질 수치를 감소시킨다는 놀랍고 예상치 못한 발견에 기초한다. 더구나, 본 명세서에 기재된 rhNaGlu는 포유동물 세포(예를 들면, 인간 세포)에 효과적으로 채워져, 특이적 글라이코실화를 생성하도록 설계되지 않은 비변형 포유동물 세포로부터 생성되고 분비되는 NaGlu 단백질과 비교하여 효소 활성을 증가시킨다. NaGlu 단백질의 세포 흡수 증가는 용량 빈도 및 양 증가의 필요성을 최소화하여 면역원성의 잠재적 위험을 크게 감소시킴으로써 B형 산필립포 증후군을 겪는 인간 환자에 대한 효소 대체 치료에서의 사용에 대한 이점을 또한 제공한다.

[0009] 본 명세서에 기재된 rhNaGlu 단백질은 만노스 및/또는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통한 효과적인 세포 흡수를 허용하고 인간 세포로 정확히 표적화되는 충분한 양의 올리고당(예를 들면, 만노스 및 인산화 만노스(즉, M6P))을 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 적어도 1몰의 단백질, 예를 들면 1, 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 NaGlu 결핍 인간 세포로 내재화되어 내재화된 단백질 전부(100% 이상)가 NaGlu 결핍 세포에서 NaGlu 활성의 정상 수치(즉, 야생형 수치)를 복구할 수 있다.

[0010] 만노스의 인산화로부터 이익을 받는 rhNaGlu를 발현하는 형질전환 조류를 생성하는 방법이 또한 개시되어 있다. 특히, 형질전환 조류는 나팔관 세포에서 rhNaGlu 단백질을 발현하고 나팔관의 자궁강(lumen)으로 분비하고 난백으로 단백질을 침착시킨다. 이러한 rhNaGlu를 포함하는 조류 알(egg)이 본 발명에 또한 포함된다.

[0011] 본 발명은 또한 rhNaGlu를 코딩하는 전이유전자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포, 및 B형 산필립포 증후군의 치료를 위한 이러한 rhNaGlu의 용도에 사용되는 rhNaGlu를 포함하는 약제학적 조성물을 고려한다.

- [0012] 일 양태에서, 본 발명은 서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열을 포함하는 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(rhNaGlu)의 단리 혼합물을 포함하는 조성물로서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 10%는 만노스-6-포스페이트(M6P)를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 실시양태에서, M6P를 갖는 rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 포유동물 세포로 채워질 수 있어서 내재화된 rhNaGlu는 동일한 유형의 야생형 포유동물 세포에서 관찰된 정상 NaGlu 활성 중 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%를 복구한다. 다른 실시양태에서, 글라이칸 구조는 N-연결 글라이칸이다.
- [0013] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 적어도 1몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 1 내지 약 6몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 2몰의 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 3몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 4몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 5몰의 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 6몰의 M6P를 포함한다.
- [0014] 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 포유동물 세포는 인간 세포이다. 다른 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 피부 섬유아세포, 간세포 또는 대식세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 신경 세포이다.
- [0015] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달된다. 특정한 일 실시양태에서, rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달된다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 척추강내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달된다.
- [0016] 일 실시양태에서, M6P를 갖는 rhNaGlu는 NaGlu 결핍 세포에 의해 내재화되어 생체내 정상 NaGlu 활성 중 적어도 100%를 복구한다. 일 실시양태에서, M6P를 갖는 rhNaGlu는 단백질 1몰당 적어도 25몰의 만노스를 포함한다.
- [0017] 일 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%는 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 20%는 적어도 1종의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 30%는 적어도 1종의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 40%는 적어도 1종의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 50%는 적어도 1종의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 상기 혼합물 내의 rhNaGlu 중의 적어도 60%는 적어도 1종의 M6P를 포함한다.
- [0018] 다른 양태에서, 본 발명은 서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열을 포함하는 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(rhNaGlu)의 단리 혼합물을 포함하는 조성물로서, 상기 혼합물은 만노스-6-포스페이트(M6P)를 포함하는 1개 이상의 글라이칸 구조를 포함하는 충분한 양의 rhNaGlu를 포함하여 M6P를 함유하는 rhNaGlu는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물 세포로 내재화되고 내인성 NaGlu를 발현하는 동일한 유형의 야생형 세포에서 관찰된 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구하는 조성물을 제공한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 N-연결 글라이코실화된다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 O-연결 글라이코실화된다.
- [0019] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 적어도 1몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 3몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 4몰의 M6P를 포함한다.
- [0020] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 만노스를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 갈락토스를 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc)을 포함한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 푸코스를 포함하지 않는다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 글루코스를 포함하지 않는다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 정상 NaGlu 효소 활성 중 적어도 60, 70, 80, 90, 95 또는 100%를 복구한다.
- [0021] 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 척추강내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다.
- [0022] 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 포유동물 세포는 인간 세포이다. 다른 실시양태에서, 인간 세포는 피부 섬유아세포, 간세포 또는 대식세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 신경 세포이다.
- [0023] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 제2 모이어티를 포함하는 융합 단백질이다. 일 실시양태에서, 제2 모이어티는 폴리펩타이드이다. 다른 실시양태에서, 폴리펩타이드는 트랜스페린 수용체 리간드(transferrin receptor ligand):

TfRL), 인슐린양 성장 인자 수용체(insulin-like growth factor receptor: IGF2R) 리간드, 저밀도 지방단백질(low density lipoprotein: LDL) 수용체 리간드 및 산성 아미노산(acidic amino acid: AAA) 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0024] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 형질전환 조류로부터 생성된다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류는 닭, 칠면조, 오리 또는 메추라기이다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류는 닭이다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 나팔관 세포로부터 생성된다.
- [0025] 다른 양태에서, 본 발명은 충분한 양의 만노스-6-포스페이트(M6P)를 갖는 1개 이상의 글라이칸 구조를 포함하는 단리된 재조합 인간 N-아세틸-알파-D-글루코사미니다제(rhNaGlu)를 포함하는 조성물로서, M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물 세포로 rhNaGlu를 내재화시켜, rhNaGlu가, *생체내* 내재화될 때, 내인성 NaGlu를 발현하는 동일한 유형의 야생형 세포에서 관찰된 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 일 실시양태에서, rhNaGlu 단백질은 N-연결 글라이코실화된다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu 단백질은 O-연결 글라이코실화된다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 M6P를 포함한다.
- [0027] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 전신 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다. 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 척추강내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 뇌에 효과적으로 전달한다.
- [0028] 다른 양태에서, 본 발명은 재조합 인간 NaGlu(rhNaGlu)를 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류로서, 전이유전자는 형질전환 조류의 게놈에 포함되고 나팔관 세포에서 발현되어 rhNaGlu가 형질전환 조류의 나팔관 세포에서 글라이코실화되고 나팔관의 자궁강으로 분비되며 형질전환 조류의 알의 난백에 침착된 형질전환 조류를 제공한다.
- [0029] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 rhNaGlu 1몰당 약 2, 3, 4 또는 6몰의 M6P를 포함한다. 다른 실시양태에서, 프로모터 성분은 나팔관 특이적 프로모터이다. 다른 실시양태에서, 나팔관 특이적 프로모터는 오브알부민 프로모터이다. 또 다른 실시양태에서, 형질전환 조류는 닭, 칠면조, 오리 및 메추라기로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0030] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 형질전환 조류에 의해 생산된 알을 제공한다.
- [0031] 또 다른 양태에서, 본 발명은 재조합 인간 NaGlu(rhNaGlu)를 생성하는 방법으로서, a) 서열 번호 1의 24 내지 743번에 기재된 rhNaGlu를 코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 성분을 갖는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류를 생성하는 단계, b) 난백으로부터 rhNaGlu를 단리시키는 단계를 포함하고, 전이유전자는 형질전환 조류의 게놈에 포함되고 나팔관 세포에서 발현되어 rhNaGlu는 형질전환 조류의 나팔관 세포에서 글라이코실화되고 나팔관의 자궁강으로 분비되며 형질전환 조류가 낳은 알의 난백에 침착된 방법을 제공한다.
- [0032] 일 실시양태에서, 프로모터 성분은 나팔관 특이적 프로모터이다. 다른 실시양태에서, 나팔관 특이적 프로모터는 오브알부민 프로모터이다. 일 실시양태에서, 조류는 닭, 칠면조, 오리 및 메추라기로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 조류는 닭이다.
- [0033] 다른 양태에서, 본 발명은 오브알부민 프로모터에 작동적으로 연결된 인간 NaGlu를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 다른 양태에서, 본 발명은 서열 번호 4의 5232-10248번의 핵산 서열을 포함하는 단리 핵산을 제공한다.
- [0034] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물과 함께 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다.
- [0035] 다른 양태에서, 본 발명은 정맥내 투여될 때 NaGlu 결핍증을 갖는 포유동물의 혈액 뇌 장벽을 횡단하는 재조합 인간 NaGlu 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 NaGlu 결핍증을 겪는 피험체를 치료하는 방법으로서, 치료학적 유효량의 본 발명의 조성물을 피험체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 NaGlu 결핍증을 겪는 피험체의 뇌에 재조합 인간 NaGlu 단백질을 전달하는 방법으로서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 피험체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0038] 다른 양태에서, 본 발명은 혈액 뇌 장벽을 거친 순환으로부터 재조합 인간 NaGlu 단백질을 치료학적 유효량으로



수송하는 방법으로서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 NaGlu 결핍증을 앓는 피험체에게 정맥내 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0039] 일 실시양태에서, NaGlu 결핍증은 B형 산필립포 증후군이다. 다른 실시양태에서, 피험체는 인간이다.

[0040] 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 약 0.5 내지 약 50mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 정맥내 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 약 1 내지 약 30mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 정맥내 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 약 6 내지 약 27mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 정맥내 투여한다.

[0041] 또 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 피험체에게 척추강내 투여한다. 일 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 적어도 약 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 척추강내 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 척추강내 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 약 10 내지 약 30mg/kg(체중)의 용량으로 피험체에게 척추강내 투여한다.

[0042] 다른 실시양태에서, 치료학적 유효량은 피험체의 뇌, 신장, 또는 간에서 황산헤파란 수치를 감소시키기에 효과적인 양이다. 다른 실시양태에서, 치료학적 유효량은 피험체의 뇌 또는 간에서 NaGlu 활성을 증가시키기에 효과적인 양이다.

[0043] 다른 실시양태에서, 상기 방법은 제2 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시양태에서, 제2 치료제는 면역억제제이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 인간 재조합 NaGlu의 아미노산 서열(1-23번 아미노산 잔기, 신호 펩타이드)을 도시한 도면;
- 도 2는 신호 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 인간 재조합 NaGlu의 핵산 서열(cDNA)을 도시한 도면;
- 도 3은 1.1kb 오브알부민 프로모터의 핵산 서열을 도시한 도면;
- 도 4a 내지 도 4d는 조류의 형질전환에 사용된 pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu 벡터의 핵산 서열을 도시한 도면;
- 도 5는 pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu 벡터의 도식적 도해;
- 도 6은 형질전환 갈루스의 난백으로부터 분리되고 정제된 rhNaGlu의 웨스턴 분석을 도시한 도면;
- 도 7은 형질전환 갈루스의 난백에 침착된 rhNaGlu의 평균 농도를 도시한 도면;
- 도 8은 HPAEC-PAD를 사용하는 형질전환 갈루스로부터 생성된 rhNaGlu의 올리고당 프로필을 도시한 도면;
- 도 9는 인간 피부 섬유아세포에 의한 rhNaGlu의 흡수 분석(IIIB형 MPS, NaGlu 결핍; 정상, 야생형 인간 피부 섬유아세포; 효소 활성의 1U = nmol의 단백질/시간)을 도시한 도면;
- 도 10은 다양한 농도의 M6P 당당류를 사용하는 rhNaGlu(갈루스)의 흡수 억제 분석(효소 활성의 1U =  $\mu$ mol의 단백질/분)을 도시한 도면;
- 도 11은 재조합 인간 NaGlu 융합 구성체(AAA-NaGlu: 전장 NaGlu의 N 말단에 융합된 산성 아미노산 잔기)를 포함하는 pTT22 벡터의 도식적 도해를 도시한 도면;
- 도 12는 재조합 인간 NaGlu 융합 구성체(NaGlu- TfRL: 전장 NaGlu의 C 말단에 융합된 트랜스페린 수용체 리간드)를 포함하는 pTT22 벡터의 도식적 도해를 도시한 도면;
- 도 13은 갈루스로부터 생성된 rhNaGlu와 비교하여 HEK293으로부터 생성된 AAA-NaGlu의 효소 활성을 도시한 도면;
- 도 14는 HEK293으로부터 생성된 AAA-NaGlu와 비교하여 HEK293으로부터 생성된 NaGlu-TfRL의 효소 활성을 도시한 도면;
- 도 15는 시간(48시간)에 따른 대식세포 세포주(NR8383)로의 rhNaGlu(갈루스)의 흡수 수치를 도시한 도면. 세포 NaGlu 활성을 단위/mg(단백질)으로 측정한다;
- 도 16은 비히클(KO); 6.25mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스; 또는 27mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스의

정맥내 투여 후 *naglu* (<sup>-/-</sup>) 마우스의 신장에서 황산헤파란 기질 수치( $\mu\text{g}/\text{mg}$ (조직))를 도정한 도면. 야생형(WT) 마우스를 비치료하였다;

도 17은 비히클(KO); 6.25mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스; 또는 27mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스의 정맥내 투여 후 *naglu* (<sup>-/-</sup>) 마우스의 뇌에서 황산헤파란 기질 수치( $\mu\text{g}/\text{mg}$ (조직))를 도정한 도면. 야생형(WT) 마우스를 비치료하였다;

도 18은 비히클(KO); 6.25mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스; 또는 27mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스의 정맥내 투여 후 *naglu* (<sup>-/-</sup>) 마우스의 간에서 황산헤파란 기질 수치( $\mu\text{g}/\text{mg}$ (조직))를 도정한 도면. 야생형(WT) 마우스를 비치료하였다;

도 19는 비히클(KO) 또는 0.31mg/kg의 용량 농도의 rhNaGlu 갈루스의 척추강내 투여 후 *naglu* (<sup>-/-</sup>) 마우스의 뇌에서 황산헤파란 기질 수치( $\mu\text{g}/\text{mg}$ (조직))를 도정한 도면. 야생형(WT) 마우스를 비치료하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 본 발명은 예를 들면 NaGlu 관련 질환, 예를 들면, B형 산필립포 증후군의 치료에서 치료에 유용한 재조합 인간 NaGlu 단백질(rhNaGlu)을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 본 명세서에 기재된 rhNaGlu 단백질이 만노스 및/또는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통한 효과적인 세포 흡수를 허용하고 인간 세포로 정확히 표적화되는 충분한 양의 올리고당(예를 들면, 만노스 및 인산화 만노스(즉, M6P))을 포함한다는 발견에 기초한다. 본 발명의 rhNaGlu는 인간 세포에 더 효과적으로 채워지므로, 본 발명의 rhNaGlu는 특이적 글라이코실화를 생성하도록 설계되지 않은 비변형 포유동물 세포로부터 생성되고 분비되는 NaGlu 단백질과 비교하여 효소 활성을 증가시킨다. 추가로, 본 명세서에 기재된 rhNaGlu는 정맥내 투여될 때 rhNaGlu가 혈액 뇌 장벽(BBB)을 효과적으로 횡단하게 하는 1종 이상의 글라이코실화 패턴을 갖는다. 본 발명의 rhNaGlu 단백질의 세포 흡수 증가는 크고 빈번한 투약의 필요성을 최소화하여, 면역원성의 잠재적 위험을 크게 감소시킨다.
- [0046] 본 명세서에 사용된 정의 및 약어 중 몇몇은 하기를 포함한다: aa, 아미노산(들); bp, 염기쌍(들); CDS, 코딩 서열 cDNA, RNA에 상보적인 DNA; GalNac, N-아세틸갈락토사민; Gal, 갈락토스; GlcNac, N-아세틸글루코사민; nt, 뉴클레오타이드(들); kb, 1,000개의 염기쌍;  $\mu\text{g}$ , 마이크로그램; mL, 밀리리터; ng, 나노그램; 및 nt, 뉴클레오타이드.
- [0047] 본 명세서의 본 발명을 기술하기 위해 사용되는 다양한 용어의 의미 및 범위를 예시하고 정의하도록 특정한 정의가 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0048] 본 명세서에 사용된 용어 "조류"는 닭, 칠면조, 오리, 거위, 메추라기, 꿩, 앵무새, 피리새류, 매, 까마귀 및 평홍류, 예컨대 타조, 예뵈 및 화식조류(이들로 제한되지는 않음)를 비롯한 분류학적 분류 조류(*ava*)의 유기체의 임의의 종, 아종 또는 균주를 의미한다. 상기 용어는 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*), 또는 닭, (예를 들면, 화이트 레그혼종(White Leghorn), 브라운 레그혼종(Brown Leghorn), 배러드-락(Barred-Rock), 서섹스(Sussex), 뉴 햄프셔(New Hampshire), 로드 아일랜드(Rhode Island), 아우스트랄로프(Australorp), 미노르카(Minorca), 암록스(Amrox), 캘리포니아 그레이(California Gray), 이탈리아 파티리지 컬러드(Italian Partridge-colored)의 다양한 공지된 균주, 및 칠면조, 꿩, 메추라기, 오리, 타조의 균주 및 상업용 품질로 흔히 길러진 다른 가금류를 포함한다.
- [0049] 구문 "에 기초한" 및 "로부터 유래된"은 통상적으로 전부 또는 일부 얻어진다는 것을 의미한다. 예를 들면, 특정한 레트로바이러스에 기초하거나 이로부터 유래된 또는 특정한 레트로바이러스의 뉴클레오타이드 서열에 기초한 레트로바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터의 게놈이 특정한 레트로바이러스의 게놈의 뉴클레오타이드 서열의 실질적인 부분을 포함한다는 것을 의미한다. 실질적인 부분은 특정한 유전자 또는 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 gag, pol 및/또는 env 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 바이러스 게놈의 다른 구조적 또는 기능적 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 긴 말단 반복부(long terminal repeat: LTR)를 코딩하는 서열일 수 있거나, 또는 당해 분야의 당업자가 본 명세서에서 문맥으로부터 명확히 아는 것처럼 실질적으로 완전한 레트로바이러스 게놈, 예를 들면 대부분(예를 들면, 60% 초과 또는 70% 초과 또는 80% 초과 또는 90% 초과) 또는 모든 레트로바이러스 게놈일 수 있다. 레트로바이러스에 기초하거나 이로부터 유래된 레트로바이러스 벡터의 예는 문헌 [Cosset et al., Journal of Virology (1991) vol. 65, p 3388-3394]에 개시된 조류 백혈병 레트로바이러스 (avian leukosis retrovirus: "ALV")로부터 유래된 NL 레트로바이러스 벡터(예를 들면, NLB)를 들 수 있다.

- [0050] 본 명세서에 사용된 용어 "코딩 서열" 및 "코딩 구역"은 RNA, 단백질, 또는 RNA 또는 단백질의 임의의 부분의 합성을 위해 유전 정보를 코딩하는 RNA 및 DNA 둘 다를 포함하는 뉴클레오타이드 서열 및 핵산 서열을 의미한다.
- [0051] 특정한 유기체의 게놈의 천연 부분이 아니거나 유기체의 게놈에서 비천연 자리에 도입된 뉴클레오타이드 서열은 "외래" 뉴클레오타이드 서열, "비상동" 뉴클레오타이드 서열, "재조합" 뉴클레오타이드 서열 또는 "외인성" 뉴클레오타이드 서열이라 칭한다. 또한, 단리되고 이후 유기체의 동일한 유형(예를 들면, 동일한 종)에 재도입된 뉴클레오타이드 서열은 특정한 유기체의 게놈의 천연 부분인 것으로 생각되지 않고 따라서 외인성 또는 비상동으로 생각된다. "비상동 단백질" 또는 "외인성 단백질"은 외래, 비상동 또는 외인성 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 단백질일 수 있고 따라서 숙주 유기체의 세포에서 대개 천연 발현되지 않는다.
- [0052] 핵산, 예컨대 DNA 및 RNA와 관련되어 본 명세서에 사용되는 용어 "외인성", "비상동" 및 "외래"는 상호 교환되어 사용되고 이것이 존재하는 염색체, 게놈 또는 세포의 일부로서 천연 발생하지 않거나 이것이 천연에서 발생하는 위치(들) 및/또는 양과 다른 위치(들) 및/또는 양으로 발견되는 핵산을 의미한다. 이는 게놈, 염색체 또는 세포에 내인성이 아니고 게놈, 염색체 또는 세포로 외인성으로 도입된 핵산일 수 있다. 비상동 DNA의 예는 예를 들면 코딩된 단백질의 생성을 위해 관심 대상의 유전자 생성물 또는 유전자 생성물(들)을 코딩하는 DNA를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 비상동 DNA의 예는 치료학적 단백질을 코딩하는 DNA인 추적 가능한 마커 단백질을 코딩하는 DNA를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 용어 "비상동" 및 "외인성"은 유기체에 의해 생성된 특정한 세포, 조직 또는 물질에서 정상으로 발견되지 않거나 천연 발생하는 것과 동일한 양 또는 위치로 유기체에 의해 생성된 특정한 세포, 조직 또는 물질에서 정상으로 발견되지 않는 생물분자, 예컨대 핵산 또는 단백질을 의미할 수 있다. 예를 들면, 알에 비상동 또는 외인성인 단백질은 알에서 정상으로 발견되지 않는 단백질이다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 용어 "구성체"는 천연 공급원으로부터 단리되거나 화학적으로 합성된, 또는 이들의 조합인 뉴클레오타이드 서열의 1 초과의 분절로부터 조립된 선형 또는 원형 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 DNA를 의미한다.
- [0054] 본 명세서에 사용된 용어 "상보성"은 서로 특정한 상호작용을 형성할 수 있는 2개의 핵산 분자를 의미한다. 특정한 상호작용에서, 2개의 핵산 가닥이 반대 극성일 때, 핵산의 1개의 가닥 내의 아데닌 염기는 제2 핵산 가닥 내의 타이민과 2개의 수소 결합을 형성할 수 있다. 또한 특정한 상호작용에서, 2개의 핵산 가닥이 반대 극성일 때, 핵산의 1개의 가닥 내의 구아닌 염기는 제2 핵산 가닥 내의 사이토신과 3개의 수소 결합을 형성할 수 있다. 본 명세서에 언급되는 상보성 핵산은 변형 염기를 추가로 포함할 수 있고, 변형 아데닌은 타이민 또는 변형 타이민과 수소 결합을 형성할 수 있고, 변형 사이토신은 구아닌 또는 변형 구아닌과 수소 결합을 형성할 수 있다.
- [0055] 본 명세서에 사용된 용어 "발현된" 또는 "발현"은 코딩 서열의 2개의 핵산 가닥 중 1개의 구역에 부분적으로 적어도 상보성인 RNA 분자를 생성시키는 코딩 서열의 전사를 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "발현된" 또는 "발현"은 단백질 또는 펩타이드를 생성시키는 mRNA의 번역을 또한 의미할 수 있다.
- [0056] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 적어도 1종의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결된 유전자 발현 제어 구역, 예컨대 프로모터 또는 프로모터 성분을 포함하는 핵산 벡터를 의미한다.
- [0057] 본 명세서에 사용된 용어 "단편"은 인공적으로(예를 들면, 화학 합성에 의해) 또는 제한 엔도뉴클레아제 또는 기계적 전단을 이용하여, 또는 효소적으로, 예를 들면 PCR 또는 당해 분야에 공지된 임의의 다른 중합 기법에 의해 천연 생성물을 복수의 조각으로 절단하여 구성되거나, 당해 분야의 당업자에게 공지된 재조합 핵산 기술에 의해 숙주 세포에서 발현된 예를 들면 핵산의 적어도 약 10개, 20개, 50개, 75개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 500개, 1000개, 2000개, 5000개, 6,000개, 8,000개, 10,000개, 20,000개, 30,000개, 40,000개, 50,000개 또는 60,000개 길이의 뉴클레오타이드 부분을 의미할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "단편"은 또한 NaGlu(즉, 서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열)에 대한 전장 아미노산 서열보다 적은 예를 들면 적어도 약 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 40개 또는 50개의 아미노산 잔기를 의미할 수 있고, 이 전장 아미노산 서열 중 일부는 적어도 1종의 프로테아제에 의해 단백질분해 절단에 의해 천연 아미노산 서열로부터 분할되거나, 화학 방법에 의해 또는 당해 분야의 당업자에게 공지된 (예를 들면, 천연 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로부터 발현되는) 재조합 DNA 기술을 이용하여 합성된 천연 아미노산 서열의 일부이다. "단편"은 또한 특정한 뉴클레오타이드 서열 또는 아미노산 서열 중 일부, 예를 들면 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99%를 의미할 수 있다.

- [0058] "기능적 부분" 및 "기능적 단편"은 상호 교환되어 사용될 수 있고 본 명세서에 사용된 바대로 전부 또는 일부로, 전체의 기능을 수행할 수 있는 전체의 일부 또는 단편을 의미한다. 예를 들면, 분자의 생물학적 기능적 부분은 전체 또는 온전한 분자의 생물학적 기능을 수행하는 분자의 일부를 의미한다. 기능적 부분은 임의의 유용한 크기일 수 있다. 예를 들면, 기능적 단편은 약 20개 염기 길이로부터 기재된 서열의 전체 길이 빼기 1개의 뉴클레오타이드에 해당하는 길이의 염기 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 50개 염기 길이로부터 기재된 서열의 전체 길이 빼기 1개의 뉴클레오타이드에 해당하는 길이에 해당하는 길이의 염기 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 50개 염기 길이로부터 약 20kb 길이의 염기 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 500개 염기 길이로부터 약 20kb 길이의 염기 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 1kb 길이로부터 약 20kb 길이의 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 0.1kb 길이로부터 약 10kb 길이의 크기 범위일 수 있다. 다른 예에서, 기능적 단편은 약 20개 염기 kb 길이로부터 약 10kb 길이의 염기 크기 범위일 수 있다.
- [0059] 용어 "완전 형질전환" 또는 "생식선 형질전환"은 실질적으로 모든 이의 세포에서 전이유전자의 적어도 1의 카피를 포함하는 조류와 같은 동물을 의미한다.
- [0060] 본 명세서에 사용된 용어 "유전자 발현 제어 구역"은 코딩 서열과 관련되고 코딩 서열의 발현을 전체적으로 또는 부분적으로 조절하는, 예를 들면 코딩 서열의 전사를 전체적으로 또는 부분적으로 조절하는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 유전자 발현 제어 구역은 천연 공급원으로부터 단리되거나 화학적으로 합성되고 핵산 벡터로 도입되어 적절한 세포에서 전사를 조절할 수 있다. "유전자 발현 제어 구역"은 mRNA로 전사될 수 있는 코딩 서열의 말단의 5' 구역에 있는 핵산 서열의 구역에 선행할 수 있지만, 선행으로 제한되지는 않는다.
- [0061] 본 명세서에 사용되는 "숙주 세포"는 재조합 DNA 기법을 이용하여 구성되고 적어도 1종의 비상동 유전자를 코딩하는 벡터를 보유하는 세포를 의미한다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 용어 "단리 핵산"은 예를 들면 (a) 천연 게놈 분자의 일부의 서열을 갖지만 이것이 천연 발생하는 종의 게놈 내에 그 분자의 일부를 플랭킹하는(flanck) 적어도 1종의 서열에 의해 플랭킹되지 않은 DNA; (b) 생성된 벡터 또는 게놈 DNA가 핵산이 얻어진 천연 DNA와 동일하지 않은 방식으로 원핵생물 또는 진핵생물의 벡터 또는 게놈 DNA로 도입된 핵산; (c) 별개의 분자, 예컨대 cDNA, 게놈 단편, 중합효소 사슬 반응(PCR), 리가제 사슬 반응(LCR) 또는 화학 합성에 의해 생성된 단편 또는 제한 단편; (d) 하이브라이드 유전자, 즉 융합 단백질 코딩하는 유전자의 일부인 재조합 뉴클레오타이드 서열, 및 (e) 천연이 아닌 하이브라이드 서열의 일부인 재조합 뉴클레오타이드 서열을 포괄한다. 본 발명의 단리 핵산 분자는 예를 들면 천연 대립유전자 변이체 및 뉴클레오타이드 결실, 삽입, 역위 또는 치환에 의해 변형된 핵산 분자를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 용어 "핵산"은 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드의 임의의 선형 또는 순차적 어레이, 예를 들면 cDNA, 게놈 DNA, mRNA, tRNA, 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오사이드 및 이들의 유도체를 의미한다. 논의의 용이를 위해, 비천연 핵산은 본 명세서에서 구성체로 언급될 수 있다. 핵산은 발현, 클로닝, 코스미드 및 형질전환 벡터를 포함하는 박테리아 플라스미드 벡터, 예컨대 변형 아데노바이러스, 인플루엔자 바이러스, 소아마비 바이러스, pox 바이러스, 레트로바이러스, 예컨대 조류 백혈병 바이러스(ALV) 레트로바이러스 벡터, 쥬트와 백혈병 바이러스(MLV) 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터 등 및 이의 단편(이들로 제한되지는 않음)과 같은 동물 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 또한, 핵산은 조류 백혈병 바이러스(ALV) 레트로바이러스 벡터, 쥬트와 백혈병 바이러스(MLV) 레트로바이러스 벡터 또는 렌티 바이러스 벡터 및 이의 단편의 LTR일 수 있다. 핵산은 또한 NL 벡터, 예컨대 NLB, NLD 및 NLA 및 이들의 단편 및 합성 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 화학 합성 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 핵산은 할로겐화 뉴클레오타이드, 예컨대 5-브로모유라실 및 유도체화 뉴클레오타이드, 예컨대 바이오틴 라벨링된 뉴클레오타이드(이들로 제한되지는 않음)와 같은 변형 또는 유도체화 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드를 포함할 수 있다.
- [0064] 본 명세서에 사용되는 용어 "글라이칸", "글라이칸 구조", "글라이칸 모이어티", "올리고당", "올리고당 구조", "글라이코실화 패턴", "글라이코실화 프로파일" 및 "글라이코실화 구조"는 실질적으로 동일한 의미를 갖고 각각 당 잔기로부터 형성되고 인간 NaGlu와 같은 글라이코실화된 단백질에 부착된 1종 이상의 구조를 의미한다. 예를 들면, "N-글라이칸" 또는 "N-연결 글라이칸"은 글라이코실화된 단백질의 아스파라긴 또는 아르기닌 측쇄의 질소에 부착된 글라이칸 구조를 의미한다. "O-글라이칸" 또는 "O-연결 글라이칸"은 글라이코실레이트 단백질의 세린, 트레오닌, 타이로신, 하이드록시라이신 또는 하이드록시프롤린 측쇄의 하이드록실 산소에 부착된 글라이칸 구조를 의미한다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 용어 "벡터" 및 "핵산 벡터"는 세포로 형질감염 또는 형질전환되고 숙주 세포 게놈과 독립



적으로 또는 이 내부에서 복제할 수 있는 천연 또는 합성 단일 또는 이중 가닥 플라스미드 또는 바이러스 핵산 분자를 의미한다. 원형 이중 가닥 벡터는 벡터의 뉴클레오타이드 서열에 기초한 적절한 제한 효소에 의한 처리에 의해 선형화될 수 있다. 당해 분야에서 이해되는 것처럼 벡터를 제한 효소로 절단하고 원하는 조각을 함께 결합하여 핵산을 벡터에 삽입할 수 있다. 통상적인 벡터는 복제 기원, 프로모터, 인핸서, 5' mRNA 리더 서열, 리보솜 결합 자리, 핵산 카세트, 종결 및 폴리아데닐화 자리, 및 선택 가능한 마커 서열의 기능적 유전자 발현을 허용하는 적절한 거리에서 작동적으로 연결된 구성요소로 이루어질 수 있다. 이 1종 이상의 구성요소는 특정 용도에서 생략될 수 있다. 핵산 카세트는 발현시키고자 하는 핵산 서열의 삽입을 위한 제한 자리를 포함할 수 있다. 기능적 벡터에서, 핵산 카세트는 번역 개시 및 종결 자리를 포함하는 발현시키고자 하는 핵산 서열을 포함한다. 인트론은 임의로 구성체, 예를 들면 코딩 서열에 대한 5'에 포함될 수 있다. 특정한 코딩 서열이 적절한 조절 서열을 갖는 벡터에 위치하도록 벡터가 구성되고, 제어 서열과 관련하여 코딩 서열의 위치선정 및 배향은 제어 또는 조절 서열의 "제어" 하에 코딩 서열이 전사되게 한다. 이러한 목적을 성취하기 위해 관심 대상의 특정한 단백질을 코딩하는 서열의 변형이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 몇몇 경우에 이 서열이 적절한 배향을 갖는 제어 서열에 부착될 수 있도록 이 서열을 변형하거나, 리딩 프레임을 유지하는 것이 필요할 수 있다. 제어 서열 및 다른 조절 서열은 벡터로 삽입 전에 코딩 서열에 결합될 수 있다. 대안적으로, 코딩 서열은 제어 서열을 이미 포함하는 발현 벡터 및 제어 서열의 조절 제어 하에 리딩 프레임에 있는 적절한 제한 자리에 직접 클로닝될 수 있다.

[0066] 용어 "작동적으로 연결된"은 이렇게 기재된 성분이 이의 일반 기능을 수행하도록 구성된 구성요소의 배열을 의미한다. 코딩 서열에 작동적으로 연결된 유전자 발현 제어 구역 또는 프로모터(들)(예를 들면, 프로모터 성분)는 코딩 서열의 발현을 수행할 수 있다. 제어 서열(들) 또는 프로모터는, 이의 발현을 지시하도록 기능하는 한, 코딩 서열과 인접할 필요는 없다. 따라서, 예를 들면, 개재한 비번역되지만 전사된 서열은 프로모터 서열과 코딩 서열 사이에 존재할 수 있고, 프로모터 서열은 여전히 코딩 서열에 "작동적으로 연결된" 것으로 생각될 수 있다.

[0067] 본 명세서에 사용된 "과발현"은 정상 또는 형질전환된 유기체에서 생성 수치를 초과하는 형질전환 유기체에서의 유전자 생성물의 생성을 의미한다.

[0068] 용어 "나팔관" 또는 "나팔관 조직"은 조류 나팔관, 예컨대 팽대부(magnum), 예를 들면 관상선 세포의 조직을 의미하고, 여기서 간 또는 신장 조직과 같은 조류의 다른 조직에서 생성된 단백질과 비교하여 증가량의 만노스 및 만노스-6-포스페이트(M6P) 및 실질적으로 감소량의 갈락토스 및/또는 시알산을 포함하는 N-연결 올리고당을 갖는 단백질이 생성된다.

[0069] 본 명세서에 사용된 용어 "나팔관 특이적 프로모터"는 기능적인, 즉 새의 나팔관 세포에서 많은 정도로, 예를 들면 주로(즉, 나팔관 세포에서 생성된 특정한 프로모터 유형에 의해 동물에서 생성된 전사 생성물의 50% 초과) 또는 배타적으로 코딩 서열의 전사를 제공하는 프로모터 및 프로모터 성분을 의미한다. 나팔관 특이적 프로모터의 예는 오브알부민 프로모터, 오브뮤코이드 프로모터, 난억제제 프로모터, 라이소자임 프로모터 및 오보트랜스페린 프로모터 및 이 프로모터의 기능적 부분, 예를 들면, 프로모터 성분을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 나팔관 특이적 프로모터를 사용하여 팽대부에 대한 NaGlu 단백질 발현을 제한함으로써, 새의 다른 조직에서 이 효소의 발현의 결과로서 새에 대한 해로운 생리학적 효과가 최소화될 수 있다.

[0070] 용어 "서열 동일성(%)", "동일성(%)", "% 동일성", "서열 상동성(%)", "상동성(%)", "% 상동성" 및 "서열 유사성(%)"은 각각 2개의 핵산 서열 또는 2개의 아미노산 서열 사이의 서열 일치도를 의미할 수 있다. 문헌[Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 5873-5877]에서처럼 변경된 문헌[Karlin & Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 2264-2268]의 알고리즘을 이용하여 이러한 서열 일치를 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul et al. (1990) T. Mol. Biol. Q15: 403-410]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 포함된다. NBLAST 프로그램, 스코어 = 100, 워드길이 = 12로 BLAST 뉴클레오타이드 조사를 수행하여 본 발명의 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻는다. XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 워드길이 = 3으로 BLAST 단백질 조사를 수행하여 아미노산 서열에 상동성인 아미노산 서열을 얻는다. 비교 목적을 위해 갭 정렬을 얻기 위해, 문헌[Altschul et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402]에 기재된 바대로 갭 BLAST를 이용한다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램(예를 들면, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 매개변수를 이용한다. 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 비교를 위한 프로그램을 포함하는 영국 인간 게놈 맵핑 프로젝트 자원 센터(U.K. Human Genome Mapping Project Resource Centre)의 적합한 예컨대 GCG-서열 분석 패키지과 같은 다른 알고리즘, 프로그램 및 디폴트 셋팅이 또한 적합할 수 있다. 서열은 다른 서열, 예를 들면 본 명세서에 확인된 NaGlu 단백질 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% 이상 동일할 수 있다.

- [0071] 용어 "유래의 조류"는 새, 가금류 또는 조류에 의해 생성되거나 이로부터 얻은 조성물 또는 물질을 의미한다. "조류"는 닭, 오리, 칠면조, 메추라기 및 평흥류(이들로 제한되지는 않음)를 비롯하여 가축으로 사육될 수 있는 새를 의미한다. 예를 들면, "유래의 조류"는 유래의 닭, 유래의 칠면조 및/또는 유래의 메추라기를 의미할 수 있다.
- [0072] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "올리고뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열" 및 "핵산 서열"은 본 명세서에서 상호 교환되어 사용될 수 있고, 코딩 서열, 즉 적절한 조절 또는 제어 서열의 제어 하에 위치할 때 *생체외* 또는 *생체내* 폴리펩타이드로 전사되고 번역되는 폴리뉴클레오타이드(들) 또는 핵산 서열(들); 제어 서열, 예를 들면 번역 시작 및 정지 코돈, 프로모터 서열, 리보솜 결합 자리, 폴리아데닐화 신호, 전사 인자 결합 자리, 전사 종결 서열, 상류 및 하류 조절 도메인, 인핸서(enhancer), 침묵인자(silencer), 전사 인자(들)가 결합하여 유전자의 프로모터의 활성을 긍정적으로(유도) 또는 부정적으로(억제) 변경하는 DNA 서열 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 기재된 용어에 의해 길이 또는 합성 기원에 대한 제한이 제시되지 않는다.
- [0073] 본 명세서에 사용된 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산의 중합체, 예를 들면 펩타이드 결합을 통해 연결된 연속 아미노산의 3개 이상의 아미노산을 의미한다. 용어 "폴리펩타이드"는 단백질, 단백질 단편, 단백질 유사체, 올리고펩타이드 등을 포함한다. 용어 "폴리펩타이드"는 재조합 기술을 통해 생성되거나(예를 들면, 형질전환 세포로부터 단리되는) 합성된 핵산에 의해 코딩된 상기 정의된 바와 같은 폴리펩타이드를 포함한다. 용어 "폴리펩타이드"는 화학 변형 아미노산 또는 라벨링 리간드에 공유 또는 비공유 결합된 아미노산을 포함하는 상기 정의된 바와 같은 폴리펩타이드를 추가로 고려한다.
- [0074] 본 명세서에 사용된 용어 "프로모터"는 조류 세포에서 RNA 중합효소에 의해 전사를 개시하는 데 유용한 DNA 서열을 의미한다. "프로모터 성분"은, 그 자체로 또는 다른 DNA 서열과 조합되어, 전사를 수행하거나 이를 수월하게 할 수 있는 DNA 서열이다. 프로모터 성분은 프로모터의 기능적 단편일 수 있다.
- [0075] 본 명세서에 사용된 용어 "재조합 핵산" 및 "재조합 DNA"는 진핵 또는 원핵 세포에서 천연상 발견되지 않는 적어도 2개의 핵산 서열의 조합을 의미한다. 핵산 서열은 핵산 벡터, 유전자 발현 조절 구성요소, 복제 기원, 발현될 때 항생제 내성을 부여하는 적합한 유전자 서열, 단백질 코딩 서열 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 용어 "재조합 폴리펩타이드"는 이의 위치, 순도 또는 구조가 천연 폴리펩타이드와 다르도록 재조합 DNA 기법에 의해 생성된 폴리펩타이드를 포함하도록 의도된다. 일반적으로, 이러한 재조합 폴리펩타이드는 천연에서 정상적으로 관찰된 것과 다른 양으로 세포에 존재한다.
- [0076] 본 명세서에 사용되는 용어 "조절 서열 또는 구성요소는 프로모터, 인핸서, 종결자, 정지 코돈 및 유전자 발현을 제어할 수 있는 다른 구성요소를 포함한다.
- [0077] "레트로바이러스", "레트로바이러스 입자", "형질도입 입자", 또는 "형질도입 입자"는 세포로 비바이러스 DNA 또는 RNA를 형질도입할 수 있는 복제 결합 또는 복제 경쟁 바이러스를 의미한다.
- [0078] "SIN 벡터"는 자가 불활화 벡터(self-inactivating vector)를 의미한다. 특히, SIN 벡터는, 표적 세포(예를 들면, 조류 배아 세포)의 게놈 DNA로 통합 시, 통합된 레트로바이러스 벡터의 5' LTR이 프로모터로서 작용하지 않도록 변경 게놈을 갖는 레트로바이러스 벡터이다. 예를 들면, 레트로바이러스 벡터의 5' LTR의 U3 구역을 생성시키는 레트로바이러스 벡터의 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 전부는 일단 통합되면 5' LTR의 프로모터 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 결실 또는 변경될 수 있다. 특정 예에서, 5' LTR의 U3으로부터 CAAT 박스 및/또는 TAATA 박스의 결실은 당해 분야에서 이해되는 것처럼 SIN 벡터를 생성시킬 수 있다.
- [0079] 본 명세서에 사용된 용어 "센스 가닥"은 RNA로 전사되고 유전자의 천연 폴리펩타이드 생성물로 번역될 수 있는 게놈 DNA로부터의 단일 가닥 DNA 분자를 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "안티센스 가닥"은 유전자의 센스 가닥과 상보적인 게놈 DNA의 단일 가닥 DNA 분자를 의미한다.
- [0080] "치료학적 단백질" 또는 "약제학적 단백질"은 전체적으로 또는 부분적으로 약물을 구성하는 물질이다. 특히, "치료학적 단백질" 및 "약제학적 단백질"은 전체적으로 또는 부분적으로 약물을 구성하는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0081] 본 명세서에 사용된 용어 "프로모터", "전사 조절 서열" 및 "프로모터 성분"은 코딩 서열의 전사 발현을 조절하는 뉴클레오타이드를 의미한다. 예시적인 전사 조절 서열은 인핸서 구성요소, 호르몬 반응 구성요소, 스테로이드 반응 구성요소, 음성 조절 구성요소 등을 포함한다. "전사 조절 서열"은 단리되고 벡터에 통합되어 벡터 DNA

의 부분의 적절한 세포에서 전사 조절이 가능하게 한다. "전사 조절 서열"은 mRNA로 전사된 단백질 코딩 서열의 말단의 5' 구역에 있는 핵산 서열의 구역에 선행할 수 있지만, 선행으로 제한되지는 않는다. 전사 조절 서열은 또한 단백질 코딩 구역 내에, 예를 들면 "인트론" 구역으로 확인된 유전자의 구역에 위치할 수 있다.

[0082] 본 명세서에 사용된 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 핵산을 숙주에 삽입하는 과정을 의미한다. 당해 분야의 당업자에게 많은 기법이 공지되어 있어 원핵 또는 진핵 유기체로 핵산의 형질전환 또는 형질감염을 수월하게 한다. 이 방법은 다양한 기법, 예컨대 세포를 특정 농도의 염, 예를 들면 제한 없이 칼슘염 또는 마그네슘염으로 처리하는 것, 또는 세포를 전기장, 세제 또는 리포솜 물질에 노출시켜 숙주 세포가 핵산 분자의 흡수에 경쟁적 있게 만드는 것을 포함한다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 "형질전환 동물"은 임의의 비인간 동물, 예컨대 닭을 비롯한 조류 종이고, 여기서 동물의 1종 이상의 세포가 인간 중재 방식으로, 예컨대 본 명세서에 개시된 것을 비롯하여 당해 분야에 공지된 형질전환 기법에 의해 도입된 비상동 핵산을 포함한다(예를 들면, 2007년 10월 18일자에 공개된 미국 특허 공보 제 2007/0243165호(이의 개시내용은 그 전문이 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)를 참조한다). 의도된 유전 조작에 의해, 예컨대 재조합 바이러스에 의한 마이크로주사 또는 감염에 의해 세포(예를 들면, 알 또는 배아 세포)로 핵산을 직접적으로 또는 간접적으로 도입하여 동물에 핵산을 도입한다. 용어 유전 조작은 전통적인 이종교배 또는 생체의 수정을 포함하지 않고, 오히려 재조합 DNA 분자의 도입에 관한 것이다. 이 분자는 염색체 내에 통합될 수 있거나, 이 분자는 염색체외 복제 DNA일 수 있다. 통상적인 형질전환 동물에서, 전이유전자는 세포가 표적 단백질 또는 폴리펩타이드의 재조합 형태를 발현하도록 할 수 있다. 용어 "키메라 동물" 또는 "모자이크 동물"은 본 명세서에 사용되어 동물의 모두가 아닌 몇몇 세포에서 전이유전자가 발견되거나, 재조합 뉴클레오타이드 서열이 발현되는 동물을 의미한다. 생식선 키메라 동물은 이의 생식 세포에서 전이유전자를 포함하고 자손의 대부분 또는 모든 세포가 전이유전자를 포함하는 자손 형질전환 동물을 생성할 수 있다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 용어 "전이유전자"는 이것이 도입된 동물 또는 세포에 부분적으로 또는 전체적으로 비상동인, 즉 외래인 또는 이것이 삽입된 유기체의 게놈을 변경하는 방식으로(예를 들면, 이것이 천연 유전자와 다른 위치에 삽입되거나 이의 삽입이 넉아웃을 발생시킴) 이것이 동물 또는 세포 게놈에 도입되지만 삽입되도록 설계되거나, 삽입된 형질전환 동물 또는 세포의 내인성 유전자에 부분적으로 또는 전체적으로 상동성인(예를 들면 인간 NaGlu 단백질을 코딩하는) 핵산 서열을 의미한다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 용어 "효소 대체 치료(ERT)"는 분실 효소를 피험체에 투여함으로써 피험체에서 효소 결핍을 보정하기 위한 치료학적 전략을 의미한다. 리소좀 효소 대체 치료가 효과적이라도, 치료학적 효소는 저장 결함이 나타난 조직에서 적절한 세포 내의 리소좀에 전달되어야 한다. 일 실시양태에서, 정맥내, 척추강내, 대뇌내, 뇌실내, 또는 실질내 피험체에게 효소를 투여할 수 있다. 일 실시양태에서, 효소는 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단할 수 있다. 기전에 제한되도록 의도함이 없이, 혈액이 환자 조직을 관류하면서, 효소가 세포로 채워지고 리소좀으로 수송되고, 리소좀에서 효소가 효소 결핍으로 인해 리소좀에 축적된 물질을 제거하도록 작용한다고 생각된다.

## [0086] I. NaGlu의 조성물

[0087] 본 발명은 예를 들면 B형 산필립포 증후군(점액 다당류증(MPS) IIIB)의 치료에서 치료에 특히 유용한 세포 흡수 증가 및 세포이화 활성 증가를 부여하는 글라이코실화의 패턴을 갖는 재조합 인간 NaGlu(rhNaGlu 또는 NaGlu)(서열 번호 1에 기재된 24 내지 743번 아미노산 서열)의 신규한 조성물을 제공한다.

[0088] 몇몇 양태에서, 상기 조성물은 서열 번호 1의 24 내지 743번 아미노산 서열을 포함하는 rhNaGlu의 단리 혼합물일 수 있다. 일 실시양태에서, 상기 혼합물은 인산화 만노스(예를 들면, M6P) 또는 만노스를 포함하는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 갖는 충분한 양의 rhNaGlu를 포함하여 M6P 또는 만노스를 포함하는 rhNaGlu가 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되고 내인성 NaGlu를 활발히 발현하는 동일한 유형의 야생형 인간 세포에서 관찰된 NaGlu 활성 중 적어도 50%를 복구한다. 일 양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 10%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 20%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 30%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 40%는 인산화

만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 50%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 60%는 인산화 만노스 및/또는 만노스를 갖는 적어도 1개의 글라이칸 구조를 포함한다.

[0089] 몇몇 양태에서, NaGlu는 1종 이상의 N-연결 글라이칸 구조를 포함한다. NaGlu는 만노스 6-포스페이트 수용체 (M6P 수용체)가 단백질을 인식하고, 이후 피부 섬유아세포, 내피, 신경 세포, 간세포, 대식세포 또는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 세포 표면에서 M6P 수용체를 발현하는 임의의 세포(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 인간 세포로 채워지게 하는 적어도 1종의 인산화 만노스(예를 들면, M6P 또는 바이스-M6P)를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 적어도 1종의 만노스(Man)를 포함한다. 다른 실시양태에서, NaGlu는 적어도 1종의 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 포함한다.

[0090] 몇몇 양태에서, NaGlu 인산화 만노스(M6P)를 포함하는 글라이칸 구조를 포함한다. 본 명세서에 사용된 M6P는 임의의 인산화 만노스 잔기를 포괄할 수 있고 모노- 및 바이스-인산화 만노스를 포함한다. 일 실시양태에서, M6P는 단백질 1몰당 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5 또는 약 6몰(들)의 농도로 존재한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 2, 약 3, 약 4, 또는 약 5몰의 농도로 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 2몰의 농도로 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 3몰의 농도로 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 4몰의 농도로 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 5몰의 농도로 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 6몰의 농도로 M6P를 포함한다.

[0091] 몇몇 양태에서, rhNaGlu는 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 세포 표면 위에 M6P 수용체를 갖는 인간 세포에 세포 흡수하기 위한 충분한 양의 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, 인간 세포에 세포 흡수하기 위한 충분한 양의 M6P는 단백질 1몰당 약 1, 2, 3, 4, 5 또는 6몰이다. rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되어 내재화된 단백질 전부(100% 이상)가 NaGlu가 결핍된 인간 세포에서 NaGlu 활성화의 정상 수치를 복구할 수 있다. 일 실시양태에서, 내재화된 rhNaGlu 단백질 전부가 적어도 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 인간 세포에서 NaGlu 활성화의 정상 수치를 복구한다. 일 실시양태에서, 내재화된 단백질 전부가 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 NaGlu가 결핍된 인간 세포에서 NaGlu 활성화의 정상 수치를 복구한다. 일 실시양태에서, 내재화된 단백질 전부가 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 인간 세포에서 NaGlu 활성화의 정상 수치를 복구한다. 본 명세서에 사용된 NaGlu 활성화의 정상 수치는 정상 NaGlu 효소를 활발히 발현하는 동일한 유형의 야생형 인간 세포에서 측정된 NaGlu 활성화 수치이다.

[0092] 몇몇 양태에서, rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되어 단백질은 동일한 유형의 정상 인간 세포의 NaGlu 활성화 중 적어도 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95%를 복구할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되어 내재화된 rhNaGlu는 동일한 유형의 정상 인간 세포에서 관찰된 것보다 높은 효소 활성을 제공할 수 있다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되어 내재화된 rhNaGlu는 동일한 유형의 정상 인간 세포에서 관찰된 것보다 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배 및 약 10배 높은 활성을 제공한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 NaGlu가 결핍된 인간 세포로 내재화되어 내재화된 rhNaGlu는 정상 인간 세포에서 관찰된 것보다 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 60배, 약 70배, 약 80배, 약 90배 또는 약 100배 높은 활성을 제공한다.

[0093] 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 세포 표면 위에 1종 이상의 M6P 수용체를 발현하는 임의의 NaGlu가 결핍된 인간 세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 황산헤파란을 축적하는 IIIB형 인간 점액 다당류증(MPS) 섬유아세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 간세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 신경 세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 내피 세포이다. 일 실시양태에서, NaGlu가 결핍된 인간 세포는 대식세포이다.

[0094] 몇몇 양태에서, 인간 세포로의 rhNaGlu 흡수는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9 또는 약 10mM의 경쟁 M6P 단당류의 존재로 억제된다. 몇몇 양태에서, rhNaGlu의 세포 흡수는 약 0.1, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.4, 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9 또는 약 1.0mM의 M6P 단당류의 존재로 억제된다. 일 실시양태에서, rhNaGlu의 세포 흡수는 약 0.01, 약 0.02, 약 0.03, 약 0.04, 약 0.05, 약 0.06, 약 0.07, 약 0.08, 또는 약 0.09mM의 M6P 단당류의 존재로 억제된다.

[0095] 몇몇 양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35몰의 농도로 이의 글라이칸 구조에서 만노스를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백



질 1몰당 약 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30몰의 농도로 만노스를 포함한다. rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28몰의 농도로 만노스를 포함한다. rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 24몰의 농도로 만노스를 포함한다. rhNaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 25몰의 농도로 만노스를 포함한다. rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 26몰의 농도로 만노스를 포함한다. rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 27몰의 농도로 만노스를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 20 내지 약 30몰의 농도로 만노스를 포함한다.

[0096] 몇몇 양태에서, rhNaGlu는 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)을 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 28 내지 약 42몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 30 내지 약 40몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 32 내지 약 38몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 34 내지 약 36몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 35몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu 단백질은 단백질 1몰당 약 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40몰의 농도로 GlcNAc를 포함한다.

[0097] 몇몇 양태에서, rhNaGlu는 N-아세틸갈락토사민(GalNAc) 및/또는 갈락토스(Gal)를 포함한다. GalNAc 및 Gal의 존재는 통상적으로 NaGlu가 골지 구획 내의 단백질에 첨가되는 1종 이상의 O-연결 글라이칸 구조를 포함할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명은 1종 이상의 O-연결 글라이칸 구조를 포함하는 제조함 인간 NaGlu를 포함하는 조성물을 임의로 포함한다.

[0098] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7몰의 농도로 갈락토스를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 2, 3, 4, 5 또는 6몰의 농도로 갈락토스를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 3몰의 농도로 갈락토스를 포함한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 단백질 1몰당 약 4몰의 농도로 갈락토스를 포함한다.

[0099] 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 적어도 1종의 GalNAc 분자를 포함한다. 일 실시양태에서, NaGlu는 단백질 1몰당 약 1 또는 2몰의 농도로 GalNAc를 포함한다.

[0100] 일 실시양태에서, NaGlu는 푸코스를 포함하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, NaGlu는 글루코스를 포함하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, rhNaGlu는 푸코스 및 글루코스를 포함하지 않는다.

[0101] 본 발명은 또한 rhNaGlu의 변형 핵산 서열로부터 생성된 변형 rhNaGlu 단백질의 조성물을 고려한다. 변형 핵산 서열은 기능적으로 동등한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 생성시키는 상이한 뉴클레오타이드의 결실, 삽입 또는 치환을 포함한다. 코딩된 단백질은 침묵 변화를 생성하고 기능적으로 동등한 단백질 또는 폴리펩타이드를 생성시키는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 또한 포함할 수 있다. NaGlu의 생물학적 활성이 보유되는 한, 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수화도, 친수화도 및/또는 양친매성 성질의 유사성에 기초하여 의도적인 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 예를 들면, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함할 수 있고; 양으로 하전된 아미노산은 라이신 및 아르기닌을 포함할 수 있고; 유사한 친수화도 값을 갖는 비하전 극성 헤드 기를 갖는 아미노산은 류신, 아이소류신, 및 발린; 글라이신 및 알라닌; 아스파라긴 및 글루타민; 세린 및 트레오닌; 페닐알라닌 및 타이로신을 포함할 수 있다.

[0102] 다른 양태에서, rhNaGlu는 추가의 모이어티 또는 제2 펩타이드를 포함하도록 변형될 수 있다. 비변형 NaGlu 단백질이 높은 혈청 농도에서 혈액 뇌 장벽을 횡단할 수 있지만, 중추 신경계(CNS) 표적화의 효율을 증가시키기 위해 단백질 변형을 수행할 수 있다. 일 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 리간드(TfRL)는 NaGlu 단백질의 N 또는 C 말단에서 인간 NaGlu에 부착될 수 있다. TrRL의 비제한적인 예는 THRPPMWSPVWP(서열 번호 5)이다. 일 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 리간드는 NaGlu 단백질의 인간 NaGlu C 말단에 부착될 수 있다. 다른 실시양태에서, 인간 NaGlu는 NaGlu 단백질의 N 또는 C 말단에서 인슐린양 성장 인자 수용체(IGF2R) 리간드에 융합된다. 또 다른 실시양태에서, NaGlu 단백질은 NaGlu 단백질의 N 또는 C 말단에서 저밀도 지방단백질(LDL) 수용체 리간드에 융합된다. 일 실시양태에서, NaGlu 단백질은 5개 내지 10개의 연속 산성 아미노산 잔기의 스트레치에 융합된다. 산성 아미노산 잔기는 아스파르트산(D) 또는 글루탐산(E)을 포함할 수 있다.

[0103] 일 실시양태에서, NaGlu 단백질을 코딩하는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류에서 rhNaGlu가 생성된다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류(예를 들면, 닭(갈루스))의 나팔관 세포(예를 들면, 관상선 세포)에서 rhNaGlu가 생성된다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류의 나팔관 세포(예를 들면, 관상선 세포)에서 rhNaGlu가 글라이코실화된다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 형질전환 조류의 나팔관 세포에서 생성된 rhNaGlu로부터 생긴 글라이코실화 패턴을 갖는다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류가 낳은 껍질이 딱딱한 알의 내용물로부터 rhNaGlu가 단리되

고 정제될 수 있다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류의 난백으로부터 rhNaGlu가 분리되고 정제될 수 있다.

[0104] 본 발명은 또한 NaGlu 단백질의 분리 혼합물의, 예컨대 1종 이상의 단편 및 전장 rhNaGlu(예를 들면, 서열 번호 1에 기재된 24 내지 743번)의 혼합물의 조성물을 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물의 실질적인 부분은 인산화 M6P를 포함한다. 일 실시양태에서, 혼합물 내의 rhNaGlu 중 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 50%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 60%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 70%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 80%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 90%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 95%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 96%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 97%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 98%는 M6P를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 혼합물 내의 분리된 rhNaGlu 중 적어도 99%는 M6P를 포함한다.

[0105] 임의로, 조류 또는 포유동물 발현계로부터 생성된 rhNaGlu 단백질(예를 들면, CHO, HEK293 또는 인간 피부 섬유아세포 세포주)은 추가로 변형되어 생물학적 활성을 보유하면서 세포 흡수에 대한 양호한 글라이코실화 패턴(즉, M6P의 양 증가)을 성취할 수 있다. 미국 특허 제6,679,165호, 미국 특허 제7,138,262호 또는 미국 공보 제2009/0022702호(이의 각각의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 기재된 다른 가수분해 효소에 적용되는 일반 방법에 의해 추가의 말단 M6P를 rhNaGlu에 도입할 수 있다. 예를 들면, 고 인산화 만노피라노실 올리고당 화합물은 카보닐 반응성 기 함유 화학 화합물로 유도체화된 후, rhNaGlu 단백질을 산화시켜 단백질의 1개의 글라이칸 구조에 카보닐(알데하이드)기를 생성하고, 글라이칸을 갖는 산화된 NaGlu 단백질을 유도체화된 고 인산화 만노피라노실 올리고당 화합물과 반응시켜 하이드라진 결합을 갖는 새로운 화합물을 형성한다.

## [0106] II. 벡터

[0107] NaGlu 및 적절한 전사 및 번역 제어 구성요소를 코딩하는 서열을 포함하는 발현 벡터를 구성하기 위해 당해 분야의 당업자에게 널리 공지된 방법을 이용할 수 있다. 이 방법은 생체외 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. 이러한 기법은 예를 들면 문헌[Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 및 Ausubel, F. M. et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.(이의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

[0108] rhNaGlu를 코딩하는 핵산 서열을 발현시키기 위해 다양한 발현 벡터/숙주 시스템을 사용할 수 있다. 이는 미생물, 예컨대 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 박테리아; 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모; 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 마를로바이러스) 또는 박테리아 발현 벡터(예를 들면, Ti 또는 pBR322 플라스미드)로 감염된 곤충 세포계; 또는 포유동물 세포 배양계(예를 들면, pTT22 벡터)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 산성 아미노산 잔기 및 TfRL을 코딩하는 핵산 서열에 융합된 인간 NaGlu cDNA를 포함하는 pTT22 벡터의 비제한적인 예가 도 11 및 도 12에 도시되어 있다.

[0109] 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 및 핵산 코딩 구역은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 분비 또는 신호 펩타이드를 코딩하는 추가의 코딩 구역과 관련될 수 있다. 신호 가설에 따라, 척추동물(예를 들면, 조류 또는 포유동물) 세포에 의해 분비된 단백질은 조면 소포체(ER)를 통한 성장 단백질 사슬의 수송이 개시되면 성숙 단백질로부터 절단되는 신호 펩타이드 또는 분비 리더 서열을 갖는다. 당해 분야의 당업자는 척추동물 세포에 의해 ER에서 생성된 폴리펩타이드가 폴리펩타이드의 분비 또는 "성숙" 형태를 생성하도록 완전 또는 "전장" 폴리펩타이드로부터 절단된, 폴리펩타이드의 N 말단에 융합된 신호 펩타이드를 일반적으로 갖는다는 것을 알 것이다. 특정한 실시양태에서, 천연 신호 펩타이드, 예를 들면 인간 NaGlu의 MEAVAVAAAVGVLLLAGAGGAAG(서열 번호 1의 1-23번) 신호 펩타이드 또는 작동적으로 이것과 관련된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 능력을 보유하는 이 서열의 기능적 유도체를 사용한다. 대안적으로, 비상동 신호 펩타이드(예를 들면, 비상동 포유동물 또는 조류 신호 펩타이드), 또는 이의 기능적 유도체를 사용할 수 있다. 예를 들면, 야생형 리더 서열은 예를 들면 인간 조직 플라스미노겐 활성화인자(tPA) 또는 마우스  $\beta$ -글루쿠로니다제의 리더 서열로 치환될 수 있다.

[0110] 제어 구성요소 또는 조절 서열은, 전사 및 번역을 수행하는 숙주 세포 단백질과 상호작용하는, 벡터-인헨서의

비번역 구역, 프로모터, 5' 및 3' 비번역 구역을 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 이의 강도 및 특이성이 변할 수 있다. 사용되는 벡터 시스템 및 숙주 세포에 따라, 임의의 수의 적합한 전사 및 번역 구성요소를 사용할 수 있다. 예를 들면, 박테리아계에서 클로닝될 때, 유도성 프로모터, 예컨대 블루스크립(Bluescript)(등록상표) 파지미드(미국 캘리포니아주 라즐라에 소재하는 스트라테이진(Stratagene)) 또는 pSport1(등록상표) 플라스미드(길코 비알엘(Gibco BRL)) 등의 하이브라이드 *lac-Z* 프로모터를 사용할 수 있다. 포유동물 세포계에서, 포유동물 유전자 또는 포유동물 바이러스로부터의 프로모터가 바람직하다. NaGlu를 코딩하는 서열의 복수의 카피를 포함하는 세포주를 생성하는 것이 필요한 경우, SV40 또는 EBV에 기초한 벡터를 적절한 선택 가능한 마커, 예컨대 퓨로마이신 및 암피실린(예를 들면, 도 11 및 12 참조)과 함께 또한 사용할 수 있다.

[0111] 형질전환 조류에서 rhNaGlu가 생성될 때, 본 발명은 rhNaGlu를 코딩하는 서열이 형질전환 조류에서 조직 특이적 방식으로 발현될 수 있도록 rhNaGlu 서열이 프로모터의 하류에 위치하는 것을 고려한다. 예를 들면, 프로모터는 전부는 아니지만 대부분 팽대부에 특이적인 나팔관 특이적 프로모터, 예컨대 오브알부민, 라이소자임, 콘알부민, 오보뮤코이드, 오보뮤코이드, 오보뮤신 및 오보트랜스페린 프로모터(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 나팔관 특이적 프로모터일 수 있다. 일 실시양태에서, 프로모터는 오브알부민 프로모터, 라이소자임 프로모터, 콘알부민 프로모터, 오보뮤코이드 프로모터, 오보뮤신 프로모터 및/또는 오보트랜스페린 프로모터 또는 이의 임의의 기능적 부분이다.

[0112] 대안적으로, 조류에서 인간 NaGlu의 코딩 서열을 발현시키기 위해 구성적 프로모터를 사용할 수 있다. 이런 경우, 발현은 팽대부로 제한되지 않고; 조류 내의 다른 조직(예를 들면, 혈액)에서 발현이 또한 발생한다. NaGlu의 코딩 서열 및 구성적 프로모터를 포함하는 이러한 전이유전자의 사용은 나팔관에서 단백질 발현 및 알로의 단백질의 후속 분비를 수행하거나 구동하기에 또한 적합하다. 일 실시양태에서, 구성적 프로모터는 예를 들면 거대세포바이러스(cytomegalovirus: CMV) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(rous-sarcoma virus: RSV) 프로모터, 쥐과 백혈병 바이러스(murine leukemia virus: MLV) 프로모터 및  $\beta$ -액틴 프로모터일 수 있다. 일 실시양태에서, 프로모터는 이의 임의의 기능적 부분의 CMV 프로모터, MDOT 프로모터, RSV 프로모터, MLV 프로모터 또는 마우스 유방 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus: MMTV) 프로모터이다.

[0113] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된 프로모터의 임의의 유용한 단편 또는 성분을 고려한다. 프로모터는 프로모터 구역의 적어도 1종의 분절, 단편 또는 성분, 예컨대 오브알부민, 라이소자임, 콘알부민, 오보뮤코이드, 오보뮤신, 오보트랜스페린, CMV, RSV 또는 MLV 프로모터 구역의 분절일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 관상선 세포에서 코딩 서열의 직접 발현에 대한 필수 구성요소를 포함하는 나팔관 특이적 프로모터 구역의 분절이다. 예를 들면, 나팔관 특이적 프로모터의 분절, 부분 또는 단편 및/또는 이것이 나팔관의 팽대부의 관상선 세포에서 발현에 필요한 서열을 보유하도록 나팔관 특이적 프로모터의 중요한 조절 구성요소의 응축이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 일 실시양태에서, 오브알부민 프로모터 구역의 분절을 사용한다. 이 분절은 오브알부민 유전자의 5' 플랭킹 구역을 포함한다.

[0114] 조류 또는 포유동물 계놈으로의 안정한 통합을 생성하고 생식선 형질전환 조류 또는 포유동물 세포주를 생성하기 위해 조류 또는 포유동물 세포의 포배엽 세포를 형질감염시키기 위해 인간 NaGlu에 대한 코딩 서열을 포함하는 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 벡터의 비제한적인 예가 도 4a 내지 도 4d 및 도 5에 도시되어 있다. 조류 발현계에서, 인간 NaGlu 코딩 서열은 형질전환 조류에서, 특히 조류 나팔관의 팽대부의 관상선 세포에서 코딩 서열을 발현하는 위치 관계로 프로모터에 작동적으로 연결되어, 제조한 인간 NaGlu 단백질은 형질전환 조류가 낳은 껍질이 딱딱한 알의 난백에 발현되고 침착된다. 조류계에서 rhNaGlu를 발현시키기 위해 벡터를 제조하는 추가의 적합한 벡터 및 방법이 미국 특허 제6,730,822호; 미국 특허 제6,825,396호; 미국 특허 제6,875,588호; 미국 특허 제7,294,507호; 미국 특허 제7,521,591호; 미국 특허 제7,534,929호; 미국 공보 제2008/0064862A1호; 및 미국 특허 공보 제2006/0185024호(이의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 또한 개시되어 있다. 본 발명에서 또한 유용할 수 있는 다른 프로모터의 비제한적인 예는 Pol III 프로모터(예를 들면, 1형, 2형 및 3형 Pol III 프로모터), 예컨대 H1 프로모터, U6 프로모터, tRNA 프로모터, RNase MPR 프로모터 및 이 프로모터의 각각의 기능적 부분을 포함한다. 통상적으로, 사용되는 프로모터에 따라 본 발명에서 사용하기 위해 기능적 종결자 서열을 선택한다.

[0115] 일 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이고, 여기서 코딩 서열 및 프로모터는 레트로바이러스 벡터의 5' LTR와 3' LTR 사이에 둘 다 위치한다. 유용한 일 실시양태에서, LTR 또는 레트로바이러스 벡터는 조류 백혈병 바이러스(ALV), 쥐과 백혈병 바이러스(MLV) 또는 렌티 바이러스 유래이다. 조류 계놈으로 전이유전자를 무작위로 도입하기 위한 유용한 하나의 레트로바이러스는 복제 결핍 ALV, 복제 결핍 MLV 또는 복제 결핍 렌티 바이러스

스이다.

[0116] 본 발명은 또한 자가 불활화(SIN) 벡터의 용도를 고려한다. SIN 벡터는 형질전환 조류의 나팔관에서 생성된 인간 NaGlu의 분량을 증가시키기에 유용할 수 있다. SIN 벡터가 기능적 프로모터(SIN/SC 음성 벡터)를 갖는 임의의 선택 가능한 마커 카세트를 포함하지 않을 때 이 효과가 추가로 증대될 수 있다. 일 실시양태에서, SIN 벡터는 통합된 레트로바이러스 벡터의 5' LTR이 프로모터로서 작용하지 않도록 변경 게놈을 갖는 레트로바이러스 벡터이다. 특정한 일 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터의 5' LTR의 U3 구역을 생성시키는 레트로바이러스 벡터의 뉴클레오타이드 서열의 일부 또는 전부는 일단 통합되면 5' LTR의 프로모터 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 결실 또는 변경될 수 있다. 인간 rhNaGlu의 코딩 서열에 융합된 오브알부민 프로모터 구역을 포함하는 SIN 벡터의 비제한적인 예는 도 4a 내지 도 4d 및 도 5에 도시되어 있다. 벡터의 기능적 성분은 표 1에 또한 기재되어 있다.

표 1

pSIN-OV-1.1kb-I-rhNaGlu에서의 기능적 성분

기능적 성분	서열 번호 4에서의 뉴클레오타이드 서열
폴리 A 자리	634-639
부분 알	692-945
LTR(RAV2)	1243-1588
부분 LTR(RAV2)	4691-4863
ALV CTE	4899-4986
1.1kb 난알부민 프로모터	5232-6363
DHS II	5334-5714
DHS I	6064-6364
엑손 L	6364-6410
인트론 1	6411-7999
NaGlu	8017-10248

[0117]

[0118] 본 명세서에 기재된 임의의 벡터는 예를 들면 조류의 나팔관의 관상선 세포로부터 벡터의 코딩 서열에 의해 발현된 단백질의 분비를 지시하는 신호 펩타이드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 재조합 인간 NaGlu 단백질이 달리 분비되지 않는 경우, 예를 들면 라이소자임 유전자로부터의 신호 펩타이드를 코딩하는 약 60bp를 포함하는 DNA 서열을 포함하도록 코딩 서열을 포함하는 벡터는 변형된다. 신호 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열은 벡터에 삽입되어 DNA가 코딩하는 rhNaGlu 단백질의 N 말단에 위치한다.

[0119] 추가로, 본 발명의 임의의 방법에 사용되는 벡터의 코딩 서열은 생성된 RNA에 안정성을 부여하는 3' 비번역 구역(3' UTR)이 제공될 수 있다. 3' UTR이 레트로바이러스 벡터에 첨가될 때, 프로모터, 코딩 서열 및 3' UTR의 배향은 바람직하게는 3' UTR의 생성과 관련하여 역위되어, 3' UTR의 첨가는 전장 게놈 RNA의 전사를 방해하지 않는다. 일 실시양태에서, 3' UTR은 오브알부민 유전자, 라이소자임 유전자의 또는 팽대부 세포에서 기능적인 임의의 3' UTR, 즉 SV40 후기 구역일 수 있다.

### [0120] III. 형질전환 조류

[0121] 본 명세서에 기재된 전이유전자는 조류 배아 포배엽 세포에 도입되어 이의 생식선 조직의 게놈에서 재조합 인간 NaGlu를 코딩하는 전이유전자를 운반하는 형질전환 닭, 형질전환 칠면조, 형질전환 메추라기 및 다른 조류 종을 생성할 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, 레트로바이러스 벡터의 5' LTR와 3' LTR 사이에 전이유전자를 운반하는 복제 결함 또는 복제 경쟁 레트로바이러스 입자를 갖는 배아 포배엽 세포의 형질도입에 의해 rhNaGlu를 생성하는 형질전환 조류가 생성된다. 예를 들면, 조류 백혈병 바이러스(ALV) 레트로바이러스 벡터 또는 쫓과 백혈병 바이러스(MLV) 레트로바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 바이러스 입자로 패키징된 변형 레트로바이러스 벡터의 RNA 카피를 이용하여 형질전환 조류로 발생하는 배아 포배엽을 감염시킬 수 있다.

[0122] 본 발명의 방법에 의해, 전이유전자는 다양한 조류 종의 배아 포배엽 세포에 도입될 수 있다. 예를 들면, 상기 방법은 본 발명의 단백질을 생성하기 위해 이의 생식선 조직의 게놈에서 전이유전자를 운반하는 형질전환 닭, 형질전환 칠면조, 형질전환 메추라기, 형질전환 오리 및 다른 조류 종을 생성하기 위해 적용될 수 있다. 포배엽 세포는 통상적으로 이알-길라디(Eyal-Giladi) 및 코차브(Kochav)(1976)가 정의한 VII-XII 단계 세포 또는 이의



등가물이다. 바람직한 실시양태에서, 포배엽 세포는 X 단계에 있거나 이 근처에 있다.

[0123] 포배엽 세포를 형질감염시키는 하나의 방법에서, 패키징된 레트로바이러스 기반 벡터가 조류 계놈으로 통합되도록 이 벡터를 배아 포배엽 세포로 전달하기 위해 이 벡터를 사용할 수 있다. 이러한 바이러스 입자(즉, 형질도입 입자)는 벡터에 대해 생성되고 적정되어 배아를 주입하기 위해 사용될 수 있는 적절한 농도를 결정한다. 일 실시양태에서, 조류 알은 미국 특허 제5,897,998호(이의 개시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 그 전문이 포함됨)에 기재된 절차에 따라 윈도우되고, 알은 X 단계에 있거나 이 근처에 있는 형질도입 입자와 주입된다.

[0124] 벡터가 도입된 포배엽 세포로부터 rhNaGlu를 생성하는 본 발명의 형질전환 조류가 개발되었다. 생성된 배아는 발생하여 병아리가 성숙되게 한다. 이 단계에서, 포배엽 세포로부터 생성된 형질전환 조류는 시조(founder)로 공지되고 전이유전자를 운반하는 세포와 관련하여 키메라이고 G0이라 칭한다. G0 시조 조류는 통상적으로 각각의 삽입된 전이유전자에 대한 키메라이다. 즉, G0 형질전환 새의 세포의 몇몇만이 전이유전자를 포함한다. 몇몇 시조는 이의 나팔관의 팽대부에서 관상선 세포에서 전이유전자를 운반한다. 이 조류는 이의 나팔관에서 전이유전자에 의해 코딩된 rhNaGlu 단백질을 발현한다. NaGlu 단백질은 또한 나팔관 이외의 다른 조직(예를 들면, 혈액)에서 발현될 수 있다. 몇몇 시조는 생식선 조직의 계놈에서 전이유전자를 운반하고 외인성 단백질을 발현하는 나팔관 팽대부 관상선 세포에서 전이유전자를 또한 운반할 수 있는 생식선 시조가다.

[0125] 형질전환 조류는 멘델 방식으로 안정하게 조류의 자손에 외인성 전이유전자의 전이를 제공하는 이의 생식선에서 전이유전자를 운반할 수 있다. G0 생성은 통상적으로 rhNaGlu를 코딩하는 전이유전자에 반접합(hemizygous)이다. G0 생성은 비형질전환 동물에 길러져 전이유전자에 또한 반접합이고 실질적으로 모든 새의 세포에서 전이유전자를 포함하는 G1 형질전환 자손을 생성할 수 있다. G1 반접합 자손은 비형질전환 동물에 길러져 G2 반접합 자손을 생성하거나, 함께 길러져 전이유전자에 반접합인 G2 자손을 생성할 수 있다. G1 자손 유래의 전이유전자에 양성인 조류의 실질적으로 모든 세포는 전이유전자를 포함한다. 일 실시양태에서, 동일한 세포주로부터의 반접합 G2 자손은 길러져 전이유전자에 반접합인 G3 자손을 생성할 수 있다. 다른 실시양태에서, 반접합 G0 또는 G1 동물은 예를 들면 함께 길러져 동물의 각각의 세포에서 전이유전자(들)의 2개의 카피를 포함하는 동형접합 G1 자손을 생성한다. 이는 단지 특정한 유용한 사육 방법의 예이고, 본 발명은 임의의 유용한 사육 방법, 예컨대 당해 분야의 당업자 개인에게 공지된 방법의 이용을 고려한다.

#### [0126] IV. rhNaGlu의 생성

[0127] 계놈에서 rhNaGlu를 코딩하는 전이유전자를 포함하는 형질전환 조류를 사용하여 rhNaGlu가 생성될 수 있다. 일 실시양태에서, 형질전환 조류는 생식선 형질전환 닭, 메추라기, 오리 또는 칠면조이다. 특히 유용한 일 실시양태에서, 본 발명은 닭의 나팔관에서 생성될 수 있는 NaGlu의 생성에 관한 것이다.

[0128] 조류계에서(예를 들면, 조류 나팔관에서) 변형을 갖거나 갖지 않는 rhNaGlu의 생성은 본 발명의 범위 내에 있다. 일 실시양태에서, 비변형 rhNaGlu는 인간 세포에 의한 효과적인 흡수를 가능하게 하는 글라이코실화 구조(즉, M6P)를 갖는 야생형 아미노산 서열(서열 번호 1의 24 내지 743번)을 포함한다. 다른 실시양태에서, 변형 단백질은 인간 세포에 의한 효과적인 흡수를 가능하게 하는 글라이코실화 패턴(즉, M6P)을 갖는 rhNaGlu 융합 단백질일 수 있다.

[0129] 닭 나팔관에서 코딩 서열의 발현을 구동하는 조직 특이적 또는 구성적 프로모터에 작동적으로 연결된 NaGlu 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 적합한 조류 벡터는 본 명세서에 기재된 바대로 X 단계에 있거나 이 근처에 있는 닭 배아 세포에 도입된다. 형질전환된 배아 세포는 살아 있는 병아리의 부화를 실행하는 조건 하에 향온처리된다. 살아 있는 병아리를 사육하여 성숙 키메라 닭이 되고 이 닭을 자연적으로 또는 인공 수정을 통해 비형질전환 닭과 짝짓기한다. 단백질 코딩 서열의 생식선 통합을 위해 자손을 스크리닝하여 형질전환 닭을 확인한다. 형질전환 자손을 다른 형질전환 또는 비형질전환 닭과 짝짓기하여 알을 낳는 완전 생식선 형질전환 암탉을 생성할 수 있다.

[0130] 조직 특이적 방식으로 rhNaGlu는 생성될 수 있다. 예를 들면, rhNaGlu는 형질전환 조류의 나팔관, 혈액 및/또는 다른 세포 또는 조직에서 발현될 수 있다. 일 실시양태에서, NaGlu는 형질전환 조류의 나팔관의 팽대부의 관상선 세포에서 발현되고, 나팔관의 자궁강으로 분비되고, 난백에 침착된다. 일 실시양태에서, rhNaGlu를 포함하는 난백을 수확하고 4℃ 내지 -20℃의 온도에서 벌크로 저장한다. 이후, 당해 분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 알의 내용물로부터 NaGlu를 분리하고 정제한다.

[0131] 본 발명의 일 양태는 rhNaGlu 단백질을 포함하는 조류의 껍질이 딱딱한 알(예를 들면, 닭의 껍질이 딱딱한 알)에 관한 것이다. 형질전환 조류에 의해 생성되고 분비된 rhNaGlu는 인간 세포에 의한 세포 흡수에 양호한 방식

으로 글라이코실화된다. 단백질은 임의의 유용한 양으로 존재할 수 있다. 일 실시양태에서, 단백질은 껍질이 딱딱한 알당 약 0.01 $\mu$ g 내지 껍질이 딱딱한 알당 약 1그램 범위의 양으로 존재한다. 다른 실시양태에서, 단백질은 껍질이 딱딱한 알당 약 1 $\mu$ g 내지 껍질이 딱딱한 알당 약 1그램 범위의 양으로 존재한다. 예를 들면, 단백질은 껍질이 딱딱한 알당 약 10 $\mu$ g 내지 껍질이 딱딱한 알당 약 1그램 범위(예를 들면, 껍질이 딱딱한 알당 약 10 $\mu$ g 내지 껍질이 딱딱한 알당 약 400밀리그램 범위)의 양으로 존재할 수 있다.

[0132] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 알의 난백 중에 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 1ng 내지 난백 1밀리리터당 약 0.2그램 범위의 양으로 존재한다. 예를 들면, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 0.1 $\mu$ g 내지 난백 1밀리리터당 약 0.2그램 범위의 양으로 존재할 수 있다. 예를 들면, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 1 $\mu$ g 내지 난백 1밀리리터당 약 100밀리그램 범위의 양으로 존재할 수 있다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 1 $\mu$ g 내지 난백 1밀리리터당 약 50밀리그램 범위의 양으로 존재한다. 예를 들면, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 1 $\mu$ g 내지 난백 1밀리리터당 약 10밀리그램 범위의 양으로 존재할 수 있다(예를 들면, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 약 1 $\mu$ g 내지 난백 1밀리리터당 약 1밀리그램 범위의 양으로 존재할 수 있다). 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 0.1 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 0.5 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 1 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, 단백질은 난백 1밀리리터당 1.5 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 난백 1밀리리터당 0.5 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, 단백질은 난백 1밀리리터당 0.1 $\mu$ g 초과와 양으로 존재한다.

[0133] 일 실시양태에서, rhNaGlu는 20mg/ℓ, 30mg/ℓ, 40mg/ℓ, 50mg/ℓ, 60mg/ℓ, 70mg/ℓ, 80mg/ℓ, 90mg/ℓ, 100mg/ℓ, 120mg/ℓ, 130mg/ℓ, 140mg/ℓ, 150mg/ℓ, 160mg/ℓ, 170mg/ℓ, 200mg/ℓ, 300mg/ℓ, 400mg/ℓ, 500mg/ℓ, 600mg/ℓ, 700mg/ℓ, 800mg/ℓ, 900mg/ℓ 또는 1,000mg/ℓ의 난백의 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 약 100mg/ℓ의 난백의 양으로 존재한다. 일 실시양태에서, rhNaGlu는 약 200mg/ℓ의 난백의 양으로 존재한다.

## [0134] V. 숙주 세포

[0135] 본 발명은 또한, 제한 없이, 세포 배양물(예를 들면, 조류 세포, CHO 세포, HEK293 세포 및 COS 세포), 효모, 박테리아 및 식물을 포함하는 임의의 유용한 단백질 발현계에서 생성된 rhNaGlu를 고려한다.

[0136] 숙주 세포 군주는 삽입된 서열의 발현을 조절하거나 발현된 NaGlu를 원하는 방식으로 처리하는 이의 능력에 대해 선택될 수 있다. NaGlu의 폴리펩타이드의 이러한 변형은, 제한 없이, 글라이코실화, 인산화 또는 지질화를 포함한다. 이러한 변형후 활성에 대한 특이적 세포 기계 및 특징적인 기계를 갖는 상이한 숙주 세포, 예컨대 CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 및 W138은 본 발명의 융합 단백질의 정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택될 수 있다. 조류 종양 세포주는 본 발명의 폴리펩타이드를 발현시키기 위한 숙주 세포로 또한 고려된다. 유용한 조류 세포주(예를 들면, 조류 나팔관 종양 세포주)의 예는 미국 특허 공보 제2009/0253176호(이의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다.

## [0137] VI. 약제학적 조성물

[0138] 본 발명은 또한 단리된 및 실질적으로 정제된 rhNaGlu 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물을 특징으로 한다. 재조합 인간 NaGlu 단백질은 예를 들면 약제학적 제제의 일부로서 1종 이상의 담체를 사용하여 또는 담체 없이 투여할 수 있다. 담체(들)는 제제의 다른 성분과 상용성이고 이의 수혜자에게 해롭지 않다는 점에서 "허용되어야" 한다. 복합 분자를 포함하는 이러한 담체를 포함하는 조성물은 널리 공지된 종래 방법(예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 14th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.](이의 전체 교시내용은 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 의해 제제화된다. 담체는 희석제를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 약제학적 담체는 액체일 수 있고, 단백질은 용액 형태일 수 있다. 약제학적 담체는 왁스, 지방 또는 알코올일 수 있다. 다른 실시양태에서, 약제학적으로 허용되는 담체는 분말, 동결건조 분말 또는 정제 형태의 고체일 수 있다. 일 실시양태에서, 담체는 리포솜 또는 마이크로캡슐을 포함할 수 있다.

[0139] 몇몇 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 완충제를 추가로 포함한다. 예시적인 완충제는 아세트산염, 인산염, 시트르산염 및 글루탐산염 완충제를 포함한다. 예시적인 완충제는 또한 시트르산리튬, 시트르산나트륨, 시트르산칼륨, 시트르산칼슘, 락트산리튬, 락트산나트륨, 락트산칼륨, 락트산칼슘, 인산리튬, 인산나트륨, 인산칼륨, 인산칼슘, 말레인산리튬, 말레인산나트륨, 말레인산칼륨, 말레인산칼슘, 타르타르트산리튬, 타르타르트산나트륨, 타르타르트산칼륨, 타르타르트산칼슘, 숙신산리튬, 숙신산나트

류, 숙신산칼륨, 숙신산칼슘, 아세트산리튬, 아세트산나트륨, 아세트산칼륨, 아세트산칼슘 및 이들의 혼합물을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 완충제는 시트르산삼나트륨 이수화물이다. 몇몇 실시양태에서, 완충제는 시트르산 이수화물이다. 몇몇 실시양태에서, 약제학적 조성물은 시트르산삼나트륨 탈수물 및 시트르산 이수화물을 포함한다.

[0140] 몇몇 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 안정화제를 추가로 포함한다. 예시적인 안정화제는 알부민, 트레할로스, 당, 아미노산, 폴리올, 사이클로덱스트린, 염, 예컨대 염화나트륨, 염화마그네슘 및 염화칼슘, 동결건조보호제 및 이들의 혼합물을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 약제학적 조성물은 인간 혈청 알부민을 포함한다.

[0141] 몇몇 실시양태에서, 계면활성제를 약제학적 조성물에 첨가하는 것이 바람직하다. 예시적인 계면활성제는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트(예를 들면, 폴리소르베이트 20 또는 80); 폴록사머(예를 들면, 폴록사머 188); 트라이톤; 나트륨 도데실 설페이트(SDS); 나트륨 라우렐 설페이트; 나트륨 옥틸 글라이코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-설포베타인; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일- 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들면, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 아이소스테아르아미도프로필-다이메틸아민; 나트륨 메틸 코코일-, 또는 이나트륨 메틸 올레일-타우레이트; 및 모나쿠아트(MONAQUAT)(등록상표) 시리즈(미국 뉴저지주 패터슨에 소재하는 모나 인더스트리즈, 인크.(Mona Industries, Inc.)), 폴리에틸 글라이콜, 폴리프로필 글라이콜, 및 에틸렌 글라이콜 및 프로필렌 글라이콜의 공중합체(예를 들면, 플루로닉스(Pluronic), PF68 등)를 포함한다. 통상적으로, 첨가된 계면활성제의 양은 단백질 응집을 감소시키고 미립자 형성 또는 비등을 최소화하는 양이다. 예를 들면, 계면활성제는 약 0.001% 내지 0.5%(예를 들면, 약 0.005% 내지 0.05% 또는 0.005% 내지 0.01%)의 농도로 제제 내에 존재할 수 있다. 특히, 계면활성제는 대략 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% 또는 0.5% 등의 농도로 제제 내에 존재할 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0142] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 적합한 약제학적 조성물은 특히 동결건조 제제를 위해 1종 이상의 벌크화제를 추가로 포함할 수 있다. "벌크화제"는 덩어리를 동결건조 혼합물에 첨가하고 동결건조 케이크의 물리적 구조에 기여하는 화합물이다. 예를 들면, 벌크화제는 동결건조 케이크(예를 들면, 실질적으로 균일한 동결건조 케이크)의 외관을 개선할 수 있다. 적합한 벌크화제는 염화나트륨, 락토스, 만니톨, 글라이신, 스크로스, 트레할로스, 하이드록시에틸 전분을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 벌크화제의 예시적인 농도는 약 1% 내지 약 10%(예를 들면, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0%, 4.5%, 5.0%, 5.5%, 6.0%, 6.5%, 7.0%, 7.5%, 8.0%, 8.5%, 9.0%, 9.5% 및 10.0%)이다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다. 약제학적 조성물은 희석제와 재구성 시 주사용 무균 동결건조 분말 형태일 수 있다. 희석제는 주사용수, 정균 주사용수 또는 무균 식염수일 수 있다. 용합 단백질의 용액을 동결 건조하여 건조 형태의 단백질을 생성하여 동결건조 분말을 생성할 수 있다. 당해 분야에 공지된 바대로, 동결건조 단백질은 일반적으로 단백질의 액체 용액보다 안정성이 증가하고 반감기가 길다.

[0143] 약제학적 제제는 경구, 직장, 비강, 국소(협착 및 설하 포함), 질내 또는 비경구 투여에 적합한 제제를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 약제학적 제제는 척추강내, 실질내, 대뇌내, 뇌실내, 근육내, 피하 및 정맥내 투여를 포함하는 주사에 의한 투여에 적합한 제제를 포함한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 제제는 정맥내 투여에 적합하다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 제제는 척추강내 투여에 적합하다. 본 발명의 약제학적 제제는 또한 흡입 또는 통기법(insufflation)에 의한 투여에 적합한 제제를 포함한다. 제제는, 적절한 경우, 편리하게는 별개의 용량 단위로 존재할 수 있고 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 약제학적 제제를 제조하는 방법은 통상적으로 치료학적 단백질을 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다와 회합하고, 이후 필요한 경우 생성물을 원하는 제제로 성형하는 단계를 포함한다.

[0144] 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질은 (예를 들면, 주사, 예를 들면 볼루스 주사 또는 연속 점적에 의한) 비경구 투여를 위해 또한 제제화될 수 있고 앰플, 프리필드 주사기, 소용적 점적에서의 또는 첨가된 보존제를 갖는 다용량 용기에서의 단위 제형으로 제시될 수 있다. 치료학적 단백질은 예를 들면 피하 주사, 근육내 주사, 척추강내 주사, 대뇌내 주사, 실질내 주사, 뇌실내 주사, 및 정맥내(IV) 점적 또는 주사에 의해 주사될 수 있다.

[0145] 일 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질은 임의의 유용한 방법에 의해 IV 점적에 의해 정맥내 투여된다. 일 예에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질은 말초 라인을 통해 정맥내 점적에 의해 투여될 수 있다. 다른 예에서, 재조

합 인간 NaGlu 단백질은 말초에 삽입된 중추 카테터를 통해 정맥내 점적에 의해 투여될 수 있다. 다른 예에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질은 정맥 혈관 접근 포트에 부착된 보행 점적 기계에 의해 수월해진 정맥내 점적에 의해 투여될 수 있다. 정맥내 점적의 일 실시양태에서, 점적되는 약제의 양 및 환자의 이전 점적 관련 반응 이력에 따라 당해 분야의 당업자가 결정하는 바대로 1시간 내지 8시간의 기간 동안 약제를 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 IV 주사에 의해 정맥내 투여한다. 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 복강내 또는 척추강내 주사를 통해 투여할 수 있다.

[0146] 몇몇 실시양태에서, 치료학적 단백질을 점적에 의해 투여하고 점적은 연장 시간 기간, 예를 들면 30분 내지 10시간 동안 발생할 수 있다. 따라서, 점적은 예를 들면 약 1시간, 약 2시간 동안, 약 3시간, 약 4시간 또는 약 5시간 기간 동안 발생할 수 있다. 점적은 또한 다양한 속도로 발생할 수 있다. 따라서, 예를 들면, 점적 속도는 시간당 약 1ml 내지 시간당 약 20ml일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 점적 속도는 시간당 5ml 내지 10ml이다. 일 실시양태에서, 점적 속도는 시간당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20ml이다. 일 실시양태에서, 점적 속도는 0.1 내지 5mg/kg/시간이다. 일 실시양태에서, 점적 속도는 약 0.1, 약 0.2, 약 0.3, 약 0.5, 약 1.0, 약 1.5, 약 2.0 또는 약 3mg/kg/시간이다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0147] 치료학적 단백질은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀션과 같은 형태를 취할 수 있고, 제제화제, 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 재조합 인간 NaGlu 단백질은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들면 발열원 비함유 무균수와 구성되기 위한, 무균 고체의 무균 분리 또는 용액으로부터의 동결건조에 의해 얻어진, 분말 형태일 수 있다.

[0148] 생성물 품질 분석, 재구성 시간(동결건조된 경우), 재구성 품질(동결건조된 경우), 고분자량, 수분 및 유리 전이 온도에 기초하여 본 발명에 따른 제제를 평가할 수 있다. 통상적으로, 단백질 품질 및 생성물 분석은 크기 배제 HPLC(SE-HPLC), 양이온 교환-HPLC(CEX-HPLC), X선 회절(XRD), 변조 시차 주사 열량측정법(mDSC), 역상 HPLC(RP-HPLC), 다각도 광산란(MALS), 형광, 자외선 흡수, 비탁분석법, 모세관 전기영동(CE), SDS-PAGE 및 이들의 조합(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 방법을 이용한 생성물 분해 속도 분석을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 생성물 평가는 외관(액체 또는 케이크 외관)을 평가하는 단계를 포함할 수 있다.

[0149] 일반적으로, 제제(동결건조 또는 수성)를 실온에서 연장 기간 동안 저장할 수 있다. 저장 온도는 통상적으로 0℃ 내지 45℃(예를 들면, 4℃, 20℃, 25℃ 또는 45℃) 범위일 수 있다. 제제를 달 내지 년의 기간 동안 저장할 수 있다. 저장 시간은 일반적으로 24달, 12달, 6달, 4.5달, 3달, 2달 또는 1달이다. 제제를 투여에 사용되는 용기에 직접 저장하여, 이전 단계를 제거할 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0150] 제제를 재구성 용기로서 또한 작용할 수 있는 동결건조 용기(동결건조된 경우)에 직접 저장하여, 이전 단계를 제거할 수 있다. 대안적으로, 저장 동안 더 적은 증분으로 동결건조된 생성물 제제를 측정할 수 있다. 저장은 일반적으로 일광 UV 방사선, 다른 형태의 전자기 방사선, 과도한 열 또는 추위, 신속한 열 충격 및 기계적 충격에 대한 노출(이들로 제한되지는 않음)을 비롯한 단백질 분해를 발생시키는 환경을 피해야 한다. 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 또한 하기 더 자세히 기재된 다른 활성 성분, 예컨대 면역억제제, 항균제 또는 보존제를 포함할 수 있다.

## [0151] VII. 치료 방법

[0152] 본 발명은 또한 NaGlu 관련 질환, 예를 들면 B형 산필립포 증후군을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 사용되는 재조합 NaGlu는, 제한 없이, 세포 배양물(예를 들면, CHO 세포, COS 세포), 박테리아 예컨대 *E. 콜라이*, 형질전환 동물, 예컨대 포유동물 및 조류(예를 들면, 닭, 오리, 및 칠면조)를 포함하는 임의의 유용한 단백질 발현계 및 식물계(예를 들면, 좁개구리밥 및 담배 식물)에서 생성될 수 있는 재조합 NaGlu를 포함한다. 일 실시양태에서, 재조합 NaGlu는 형질전환 동물, 예컨대 조류에서 생성된다.

[0153] 일 실시양태에서, 상기 방법은 충분한 양의 올리고당(예를 들면, 만노스 및 인산화 만노스(즉, M6P))을 포함하는 재조합 인간 NaGlu 단백질(rhNaGlu), 예를 들면 재조합 인간 NaGlu 단백질을 NaGlu 결핍증 또는 NaGlu 관련 질환의 1 이상의 증상을 치료(예를 들면, 감소, 경감) 또는 예방하기에 충분한 양으로 피험체에게 투여하는 단계를 포함한다. 재조합 인간 NaGlu 단백질을 치료학적으로 또는 예방학적으로 또는 둘 다로 투여할 수 있다. 재조합 인간 NaGlu 단백질(rhNaGlu)을 단독으로 또는 본 명세서에 기재된 다른 치료학적 양상과 조합하여 피험체에게 투여할 수 있다.



- [0154] 용어 "치료한다", "치료하는" 및 "치료"는 예방학적으로 및/또는 증상이 발생한 후 질환 또는 증상을 완화, 약화 또는 경감시키거나, 추가의 증상을 예방하거나, 증상의 기초 원인을 경감 또는 예방하거나, 질환 또는 병증을 억제하거나, 질환 또는 병증의 진행을 중지시키거나, 질환 또는 병증을 없애거나, 질환 또는 병증을 회귀시키거나, 질환 또는 병증에 의해 야기된 증상을 없애거나, 질환 또는 병증의 증상을 중지시키는 방법을 의미한다.
- [0155] 본 명세서에 사용된 "치료학적 유효 용량"은 의도하는 치료학적 반응(예를 들면, 황산헤파란 수치 감소 및/또는 표적 조직에서의 NaGlu 활성 증가)을 발생시키는 데 필요한 약물의 용량(예를 들면, 양 및/또는 간격)을 의미한다. 치료학적 유효 용량은, 이러한 용량을 받지 않는 상응하는 피험체와 비교하여, 질환, 장애 또는 부작용의 처리, 치유, 예방 또는 경감의 개선, 또는 질환 또는 장애의 발병 또는 진행 속도의 감소를 발생시키는 용량을 의미한다. 상기 용어는 또한 이의 범위 내에 생리학적 기능을 증대시키기에 효과적인 용량을 포함한다.
- [0156] 본 명세서에 사용되는 용어 "피험체" 또는 "환자"는 인간 및 비인간 동물을 포함하도록 의도된다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들면 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 강아지, 소, 말, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 바람직한 피험체는 NaGlu 결핍증 또는 NaGlu 관련 질환을 앓는 인간 피험체를 포함한다.
- [0157] 본 명세서에 사용된 "NaGlu 관련 질환"은 NaGlu 활성화에 의해 중재되거나 비정상 NaGlu 발현 또는 활성과 관련되는 질환 또는 병증이다. NaGlu 관련 질환의 예는 NaGlu 결핍증, 예컨대 B형 산필립포 증후군(IIIB형 점액 다당류증으로도 공지됨)을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다.
- [0158] 본 발명의 치료학적 방법은 적절한 장치 및 조직으로 재조합 인간 NaGlu 단백질의 흡수 또는 이송을 수월하게 하는 임의의 투여 경로를 포괄한다. 일 실시양태에서, 본 발명의 방법은 NaGlu 관련 질환(예를 들면, NaGlu 결핍증)의 치료를 위해 피험체의 CNS(중추 신경계), 신장 또는 간에 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질을 전달하는 것을 포함한다. 예를 들면, 재조합 인간 NaGlu 단백질은 정맥내(예를 들면, 정맥내 주사 또는 정맥내 점적을 통해) 환자에게 투여되어 놀랍게도 NaGlu 결핍증을 앓는 피험체의 혈액 뇌 장벽(BBB)을 횡단할 수 있다. 본 발명의 다른 실시양태에서, 재조합 인간 NaGlu 단백질을 환자에게 척추강내 투여한다.
- [0159] A. 척추강내 전달용 장치
- [0160] 본 발명에 따른 척추강내 전달에 다양한 장치를 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 척추강내 투여용 장치는 유체 접근 포트(예를 들면, 주사용 포트); 유체 접근 포트와 유체 소통하는 제1 흐름 오리피스 및 척수로의 삽입을 위해 구성된 제2 흐름 오리피스를 갖는 중공체(예를 들면, 카테터); 척수에서 중공체의 삽입을 고정하기 위한 고정 기전을 포함한다. 비제한적인 예로서, 적합한 고정 기전은 중공체의 표면에 탑재된 1개 이상의 납(nob) 및 중공체(예를 들면, 카테터)가 척수로부터 튀어나오는 것을 막기 위한 1개 이상의 납 위에 조정 가능한 봉합 고리를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 유체 접근 포트는 리저버를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 유체 접근 포트는 기계적 펌프(예를 들면, 점적 펌프)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이식 카테터는 (예를 들면, 볼루스 전달을 위해) 리저버 또는 점적 펌프에 연결된다. 유체 접근 포트는 이식되거나 외부에 있을 수 있다.
- [0161] 몇몇 실시양태에서, 요추 천자(즉, 저속 볼루스)에 의해 또는 포트-카테터 전달 시스템(즉, 점적 또는 볼루스)을 통해 척추강내 투여를 수행할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 카테터를 요추 척추뼈 고리판 사이에 삽입하고 끝은 원하는 수치(일반적으로 L3-L4)로 척수경 공간(the cal space)에 트레드된다.
- [0162] 정맥내 투여에 비해, 척추강내 투여에 적합한 단일 용량 용적은 통상적으로 적다. 통상적으로, 본 발명에 따른 척추강내 전달은 CSF의 조성물의 균형 및 피험체의 두개내압을 유지시킨다. 몇몇 실시양태에서, 피험체로부터 상응하는 CSF 제거 없이 척추강내 전달을 수행한다. 몇몇 실시양태에서, 적합한 단일 용량 용적은 예를 들면 약 10ml, 8ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml, 1.5ml, 1ml 또는 0.5ml 미만일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 적합한 단일 용량 용적은 약 0.5-5ml, 0.5-4ml, 0.5-3ml, 0.5-2ml, 0.5-1ml, 1-3ml, 1-5ml, 1.5-3ml, 1-4ml 또는 0.5-1.5ml 일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 척추강내 전달은 처음에 원하는 양의 CSF를 제거하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 약 10ml 미만(예를 들면, 약 9ml, 8ml, 7ml, 6ml, 5ml, 4ml, 3ml, 2ml, 1ml 미만)의 CSF를 척추강내 투여 전에 처음에 제거한다. 이런 경우, 적합한 단일 용량 용적은 예를 들면 약 3ml, 4ml, 5ml, 6ml, 7ml, 8ml, 9ml, 10ml, 15ml, 또는 20ml 초과일 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.
- [0163] 치료학적 조성물의 척추강내 투여를 수행하기 위해 다양한 다른 장치를 사용할 수 있다. 예를 들면, 수막 암종 증에 약물을 척추강내 투여하기 위한 일반적으로 사용되는 옴마야 리저버(Ommaya reservoir)를 사용하여 원하는

효소를 포함하는 제제가 제공될 수 있다(Lancet 2: 983-84, 1963). 더 구체적으로, 상기 방법에서, 뇌실 관을 전각에 형성된 홀을 통해 삽입하고 두피 밑에 설치된 옴마야 리저버에 연결하고, 리저버는 피하로 구멍을 뚫어 리저버에 주사된 대체하고자 하는 특정 효소를 척추강내 전달한다. 치료학적 조성물 또는 제제를 개체에게 척추강내 투여하기 위한 다른 장치는 미국 특허 제6,217,552호(이의 전체 내용은, 이 장치에 관한 한, 참조문헌으로 본 명세서에 포함됨)에 기재되어 있다. 대안적으로, 예를 들면 단일 주사 또는 연속 점적에 의해 척추강내 약물을 제공할 수 있다. 용량 치료가 단일 용량 투여 형태 또는 다용량 투여 형태일 수 있는 것으로 이해되어 한다.

[0164] 주사의 경우, 본 발명의 제제를 액체 용액 중에 제제화할 수 있다. 또한, NaGlu 효소를 고체 형태로 제제화하고 사용 직전 재용해시키거나 현탁시킬 수 있다. 동결건조 형태가 또한 포함된다. 주사는 예를 들면 NaGlu 효소의 볼루스 주사 또는 (예를 들면, 점적 펌프를 사용하는) 연속 점적 형태일 수 있다.

[0165] 본 발명의 일 실시양태에서, 피험체의 뇌에 측뇌실 주사에 의해 NaGlu 효소를 투여한다. 예를 들면, 피험체의 두개 내에 만든 버홀(burr hole)을 통해 주사를 수행할 수 있다. 다른 실시양태에서, 피험체의 뇌실에 수술로 삽입된 셉트(shunt)를 통해 효소 및/또는 다른 약제학적 제제를 투여한다. 예를 들면, 더 큰 측뇌실로 주사를 수행할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 더 작은 제3 및 제4 뇌실로 주사를 또한 수행할 수 있다.

[0166] 또 다른 실시양태에서, 피험체의 대조(cisterna magna) 또는 요추 부위에 주사에 의해 본 발명에서 사용되는 약제학적 조성물을 투여한다.

[0167] 본 발명의 방법의 다른 실시양태에서, 약제학적으로 허용되는 제제는 약제학적으로 허용되는 제제를 피험체에게 투여한 후 적어도 1주, 2주, 3주, 4주 또는 더 긴 기간 동안 피험체에의 본 발명에서 사용되는 효소 또는 다른 약제학적 조성물의 지속 전달, 예를 들면 "지속 방출"을 제공한다.

[0168] 본 명세서에 사용되는 용어 "지속 전달"은 투여 후 일정 기간, 바람직하게는 적어도 수일, 1주 또는 수주 동안 *생체내* 본 발명의 약제학적 제제의 연속 전달을 의미한다. 조성물의 지속 전달은 예를 들면 시간에 따른 효소의 지속적인 치료학적 효과에 의해 입증될 수 있다(예를 들면, 효소의 지속 전달은 피험체에서 저장 과립체의 지속적인 감소량에 의해 입증될 수 있다). 대안적으로, 효소의 지속 전달은 시간에 따른 *생체내* 효소 존재를 검출함으로써 입증될 수 있다.

[0169] B. 정맥내 전달

[0170] 상기 기재된 바대로, 본 발명의 놀라운 특징 중 하나는 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질이 정맥내 투여될 때 혈액 뇌 장벽(BBB) 및 뇌 표면을 효과적으로 광범위하게 확산하고 심뇌 구역을 비롯하여 뇌의 다양한 층 또는 구역을 침투할 수 있다는 것이다. 본 발명의 방법은 기존의 CNS 전달 방법에 의해 표적화하기 힘든 중추 신경계(CNS)의 다양한 조직, 뉴런 또는 세포에 rhNaGlu 단백질을 효과적으로 전달한다. 더욱이, 본 발명의 방법은 충분한 양의 재조합 인간 NaGlu 단백질을 혈류 및 다양한 말초 장치 및 조직에 전달한다.

[0171] 대개 의학적으로 IV 푸쉬 또는 볼루스 주사라 칭하는 "정맥내 주사"는 정맥 자극 또는 너무 신속한 효과를 야기하는 경우 통상적으로 신속히 및 때때로 15분의 기간까지 주사가 IV 접근 장치에 연결되고 약제가 직접 주사되는 투여 경로를 의미한다. 약제가 IV 배관의 유체 스트림으로 주사되면, 이것이 배관으로부터 환자로 나온다는 것을 보장하는 여러 의미가 있어야 한다. 일반적으로 유체 스트림이 보통 흐르게 하여 약제를 혈류로 운반하여 이를 성취한다. 그러나, 몇몇 경우에 약제가 혈류로 진입하는 것을 수월하게 하기 위해 제1 주사 후 때때로 "플러쉬"라 칭하는 제2 유체 주사를 사용한다.

[0172] "정맥내 점적"은 연장 기간에 걸쳐 약제가 전달되는 투여 경로를 의미한다. 예를 들면, 약제를 1시간 내지 8시간의 기간에 걸쳐 환자에게 전달할 수 있다. 약제를 또한 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간 또는 약 8시간의 기간에 걸쳐 환자에게 전달할 수 있다. 정맥내 점적을 수행하기 위해, IV 중력 점적 또는 IV 펌프를 사용할 수 있다. 환자가 특정 시간에만 약제를 필요로 하고 추가의 정맥내 유체(예를 들면, 나트륨, 클로라이드, 글루코스 또는 임의의 이들의 조합을 포함하는 물 용액), 예컨대 전해질, 혈액 당 및 물 손실을 복구하는 것을 필요로 하지 않을 때 IV 점적을 통상적으로 사용한다.

[0173] C. 표적 조직

[0174] 몇몇 실시양태에서, 피험체의 중추 신경계(CNS)에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 rhNaGlu를 뇌, 척수 및/또는 말초 장치의 1 이상의 표적 조직에 전달한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "표적 조직"은 치료하고자 하는 NaGlu 관련 질환에 의해 영향을 받는 임의의 조직 또는 결핍 NaGlu가 보통 발현되는 임의의 조직을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 표적 조직은 NaGlu 관련 질환을 앓거나 이에 민감한 환자에서 예

를 들면 조직의 세포 리소좀에 저장되는 검출 가능한 또는 비정상적으로 많은 양의 효소 기질이 존재하는 조직을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 표적 조직은 질환 관련 병리학, 증상 또는 특징을 나타내는 조직을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 표적 조직은 결핍 NaGlu가 상승 수치에서 보통 발현되는 조직을 포함한다. 본 명세서에 사용된 표적 조직은 뇌 표적 조직, 척수 표적 조직 및/또는 말초 표적 조직일 수 있다. 예시적인 표적 조직은 하기 자세히 기재되어 있다.

[0175] D. 뇌 표적 조직

[0176] 일반적으로, 뇌는 상이한 구역, 층 및 조직으로 분할될 수 있다. 예를 들면, 수막 조직은 뇌를 비롯한 중추 신경계를 감싸는 막 시스템이다. 뇌막은 경막(dura matter), 지주막(arachnoid matter) 및 연막(pia matter)을 포함하는 3개의 층을 포함한다. 일반적으로, 뇌막 및 뇌척수액의 1차 기능은 중추 신경계를 보호하는 것이다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료학적 단백질은 뇌막의 1개 이상의 층에 전달된다.

[0177] 뇌는 대뇌, 소뇌 및 뇌간을 포함하는 세가지 1차 세부구획을 갖는다. 대뇌 반구는 대부분의 다른 뇌 구조 위에 위치하고 피층으로 덮인다. 대뇌 밑에 대뇌가 부착된 스톱(stalk)을 닮은 뇌간이 있다. 뇌 뒤에서, 대뇌 밑에 그리고 뇌간 뒤에 소뇌가 있다.

[0178] 뇌 중간 근처 및 중뇌 위에 위치한 간뇌는 시상, 시상후부, 시상하부, 시상상부, 시상전부 및 피개를 포함한다. 중간뇌라고도 하는 중뇌는 시개, 피개, 뇌실 중뇌수도(mesocoelia), 및 뇌각, 적핵 및 뇌신경 III 핵을 포함한다. 중뇌는 시력, 청각, 운동 조절, 수면/깨, 경계 및 온도 조절과 관련된다.

[0179] 뇌를 포함한 중추 신경계의 조직 구역은 조직 깊이와 관련하여 특징지어질 수 있다. 예를 들면, CNS(예를 들면, 뇌) 조직은 표면 또는 얇은 조직, 중간 깊이 조직 및/또는 심조직으로 특징지어질 수 있다.

[0180] 본 발명에 따라, 피험체에서 치료하고자 하는 특정 질환과 관련하여 임의의 적절한 뇌 표적 조직(들)에 본 발명의 rhNaGlu를 전달할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 표면 또는 얇은 뇌 표적 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 중간 깊이 뇌 표적 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 깊은 뇌 표적 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 표면 또는 얇은 뇌 표적 조직, 중간 깊이 뇌 표적 조직 및/또는 깊은 뇌 표적 조직의 조합에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 뇌의 외면 밑에(또는 이의 내부에) 적어도 4mm, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm, 10mm 이상 깊은 뇌 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0181] 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 1 이상의 표면 또는 얇은 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 표적화 표면 또는 얇은 조직은 대뇌의 표면으로부터 4mm 내에 위치한다. 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 표적화 표면 또는 얇은 조직은 연막 조직, 대뇌 피질 리본 조직, 해마, 비르쵸 로빈 강(Virchow Robin space), VR 강 내의 혈관, 해마, 뇌의 내면 위의 시상하부 부분, 시신경 및 시삭, 후각신경구 및 후각 투영 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0182] 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 1 이상의 심조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 표적화 표면 또는 얇은 조직은 대뇌의 표면 적어도 4mm(예를 들면, 5mm, 6mm, 7mm, 8mm, 9mm 또는 10mm) 밑에(또는 이의 내부에) 위치한다. 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 표적화 심조직은 대뇌 피질 리본을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 대뇌의 표적화 심조직은 1 이상의 간뇌(예를 들면, 시상하부, 시상, 시상전부 또는 시상하부), 소뇌, 렌즈핵, 기저핵, 미상핵, 피각, 편도체, 담창구 및 이들의 조합을 포함한다.

[0183] 몇몇 실시양태에서, 소뇌의 1 이상의 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 특정한 실시양태에서, 소뇌의 표적화된 1 이상의 조직은 분자층 조직, 푸르키네 세포층 조직, 과립 세포층 조직, 쇄뇌각 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시양태에서, 푸르키네 세포층 조직, 과립 세포층 조직, 깊은 소뇌 백질 조직(예를 들면, 과립 세포층에 비해 깊은) 및 깊은 소뇌 핵 조직(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 소뇌의 1 이상의 심조직에 치료제(예를 들면, 효소)를 전달한다.

[0184] 몇몇 실시양태에서, 뇌간의 1 이상의 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 뇌간의 표적화된 1 이상의 조직은 뇌간 백질 조직 및/또는 뇌간 핵 조직을 포함한다.

[0185] 몇몇 실시양태에서, 회백질, 백질, 뇌실 주위 부위, 연막-거미막(pia-arachnoid), 뇌막, 신피질, 소뇌, 대뇌 피질에서의 심조직, 분자층, 미상핵/피각 구역, 중간뇌, 뇌교 또는 숨뇌의 깊은 구역 및 이들의 조합(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 다양한 뇌 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다.

[0186] 몇몇 실시양태에서, 뉴런, 신경교세포, 혈관주위 세포 및/또는 수막 세포(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는

뇌에서의 다양한 세포에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 깊은 백질의 회소돌기아교세포에 치료학적 단백질을 전달한다.

[0187] E. 척수 표적 조직

[0188] 일반적으로, 척수의 구역 또는 조직은 조직의 깊이에 기초하여 특징지어질 수 있다. 예를 들면, 척수 조직은 표면 또는 얇은 조직, 중간 깊이 조직 및/또는 심조직으로 특징지어질 수 있다.

[0189] 몇몇 실시양태에서, 척수의 1 이상의 표면 또는 얇은 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 척수의 표적화 표면 또는 얇은 조직은 척수의 표면으로부터 4mm 밑에 위치한다. 몇몇 실시양태에서, 척수의 표적화 표면 또는 얇은 조직은 연막 및/또는 백질 트랙을 포함한다.

[0190] 몇몇 실시양태에서, 척수의 1 이상의 심조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 척수의 표적화 심조직은 척수의 표면으로부터 4mm 내부에 위치한다. 몇몇 실시양태에서, 척수의 표적화 심조직은 척수 회백질 및/또는 상의 세포를 포함한다.

[0191] 몇몇 실시양태에서, 척수의 뉴런에 대체 효소(예를 들면, NaGlu 융합 단백질)를 전달한다.

[0192] F. 말초 표적 조직

[0193] 본 명세서에 사용된 말초 장치 또는 조직은 중추 신경계(CNS)의 일부가 아닌 임의의 장치 또는 조직을 의미한다. 말초 표적 조직은 혈액계, 간, 신장, 심장, 내피, 골수 및 골수 유래 세포, 비장, 폐, 림프절, 뼈, 연골, 난소 및 고환을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 몇몇 실시양태에서, 1 이상의 말초 표적 조직에 본 발명의 rhNaGlu를 전달한다.

[0194] G. 생체분포 및 생체이용률

[0195] 다양한 실시양태에서, 표적 조직에 일단 전달하면, 본 발명의 rhNaGlu는 세포내 국재화된다. 예를 들면, 본 발명의 rhNaGlu는 표적 세포(예를 들면, 뉴런, 예컨대 푸르키네 세포)의 액손, 축삭, 리소좀, 미토콘드리아 또는 핵포에 국재화될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 실시양태에서 rhNaGlu가 (예를 들면, 맥박 보조 대류 기전에 의해) 혈관주위 공간 내에 이동하도록 본 발명의 rhNaGlu는 전위 동역학을 나타낸다. 또한, 신경미세섬유에 의한 투여된 단백질 또는 효소의 회합과 관련된 능동 축삭 수송 기전은 또한 중추 신경계의 더 심조직으로의 본 발명의 rhNaGlu 단백질의 분포에 기여하거나 그렇지 않으면 이를 수월하게 할 수 있다.

[0196] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 본 발명의 rhNaGlu는 본 명세서에 기재된 다양한 표적 조직에서 치료학적으로 또는 임상적으로 효과적인 수치 또는 활성을 성취할 수 있다. 본 명세서에 사용된 치료학적으로 또는 임상적으로 효과적인 수치 또는 활성은 표적 조직에서 치료학적 효과를 부여하기에 충분한 수치 또는 활성이다. 치료학적 효과는 객관적(즉, 몇몇 시험 또는 마커에 의해 측정 가능) 또는 주관적(즉, 피험체가 효과의 표시를 제공하거나 효과를 느낌)일 수 있다. 예를 들면, 치료학적으로 또는 임상적으로 효과적인 수치 또는 활성은 표적 조직에서의 질환(예를 들면, GAG 저장)과 관련된 증상을 경감시키기에 충분한 효소 수치 또는 활성일 수 있다.

[0197] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 본 발명의 rhNaGlu는 표적 조직에서 상응하는 NaGlu 효소의 정상 수치 또는 활성 중 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%인 효소 수치 또는 활성을 성취할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 본 발명의 rhNaGlu는 대조군(예를 들면, 치료 없는 내인성 수치 또는 활성)과 비교하여 적어도 1배, 2배, 3 배, 4배, 5 배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 증가한 효소 수치 또는 활성을 성취할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 표적 조직에서 적어도 대략 10nmol/시간/mg, 20nmol/시간/mg, 40nmol/시간/mg, 50nmol/시간/mg, 60nmol/시간/mg, 70nmol/시간/mg, 80nmol/시간/mg, 90nmol/시간/mg, 100nmol/시간/mg, 150nmol/시간/mg, 200nmol/시간/mg, 250nmol/시간/mg, 300nmol/시간/mg, 350nmol/시간/mg, 400nmol/시간/mg, 450nmol/시간/mg, 500nmol/시간/mg, 550nmol/시간/mg 또는 600nmol/시간/mg인 효소 수치 또는 활성 증가를 성취할 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0198] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 요추 구역을 표적화하는 데 특히 유용하다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 적어도 대략 500nmol/시간/mg, 600nmol/시간/mg, 700nmol/시간/mg, 800nmol/시간/mg, 900nmol/시간/mg, 1000nmol/시간/mg, 1500nmol/시간/mg, 2000nmol/시간/mg, 3000nmol/시간/mg, 4000nmol/시간/mg, 5000nmol/시간/mg, 6000nmol/시간/mg, 7000nmol/시간/mg, 8000nmol/시간/mg, 9000nmol/시간/mg 또는 10,000nmol/시간/mg의 요추 구역에서의 효소 수치 또는 활성 증가를 성취할 수 있다. 상기 기술된



범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

- [0199] 일반적으로, 본 발명에 따른 전달된 치료제(예를 들면, rhNaGlu)는 뇌, 척수 및 말초 장치의 CSF 및 표적 조직에서 충분히 긴 반감기를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 적어도 대략 30분, 45분, 60분, 90분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 16시간, 18시간, 20시간, 25시간, 30시간, 35시간, 40시간, 3일 이하, 7일 이하, 14일 이하, 21일 이하 또는 1달 이하의 반감기를 가질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 투여 후 12시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간, 78시간, 84시간, 90시간, 96시간, 102시간 또는 1주 후 CSF 또는 혈류에서 검출 가능한 수치 또는 활성을 보유할 수 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 검출 가능한 수치 또는 활성을 결정할 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다. 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 투여 후(예를 들면, 피험체에 약제학적 조성물을 투여한 후 1주, 3일, 48시간, 36시간, 24시간, 18시간, 12시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분 이하) 피험체의 CNS 조직 및 세포에서 적어도 30 $\mu$ g/ml의 농도를 성취한다. 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따라 전달된 rhNaGlu는 피험체에 투여 후(예를 들면, 피험체에 약제학적 조성물을 투여한 후 1주, 3일, 48시간, 36시간, 24시간, 18시간, 12시간, 8시간, 6시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분 이하) 이러한 피험체(예를 들면, 뇌 조직 또는 뉴런)의 표적화된 조직 또는 세포에서 적어도 2 $\mu$ g/ml, 적어도 15 $\mu$ g/ml, 적어도 1 $\mu$ g/ml, 적어도 7 $\mu$ g/ml, 적어도 5 $\mu$ g/ml, 적어도 2 $\mu$ g/ml, 적어도 1 $\mu$ g/ml 또는 적어도 0.5 $\mu$ g/ml의 농도를 성취한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.
- [0200] H. 산필립포 증후군의 치료
- [0201] 산필립포 증후군 또는 III형 점액 다당류증(III형 MPS)은 글라이코사미노글라이칸(GAG)의 분해와 관련되는 효소 결핍을 특징으로 하는 희귀한 유전 장애이다. 효소 부재 시, 부분 분해된 GAG 분자는 체내로부터 청소될 수 없고 다양한 조직의 리소좀에 축적되어 진행성 광범위 체성 기능부전을 발생시킨다(Neufeld and Muenzer, 2001).
- [0202] IIIA, B, C 및 D형 MPS라 칭하는 III형 MPS의 4개의 명확한 형태가 확인되었다. 각각은 GAG 황산해파란 분해와 관련된 4개의 효소 중 1개의 결핍을 나타낸다. 모든 형태는 품위없는 얼굴 특징, 간비종대, 각막 혼탁 및 골격 기형을 포함하는 다양한 정도의 동일한 임상 징후를 포함한다. 그러나, 뉴런에서 황산해파란 축적, 및 1차 GAG 축적에 의해 야기된 강글리오사이드 GM2, GM3 및 GD2의 후속 상승과 관련된 인지 능력의 중증 및 진행성 손실이 가장 주목할만 하다(Walkley 1998).
- [0203] IIIB형 점액 다당류증(IIIB형 MPS; B형 산필립포 증후군)은 효소 알파-N-아세틸-글루코사미니다제(NaGlu)의 결핍을 특징으로 하는 상염색체 열성 장애이다. 이 효소 부재 시, GAG 황산해파란은 뉴런 및 신경교세포의 리소좀에 축적되고, 뇌 바깥에 더 적게 축적된다.
- [0204] 이 장애의 한정적인 임상 특징은 주요 발육 이정표의 손실 또는 획득 실패를 발생시키는 중추 신경계(CNS) 변성이다. 진행성 인지 감소는 치매 및 조속 사망으로 끝난다. 이 질환은 통상적으로 그 자체가 유아에서 나타나고, 이환된 개체의 수명은 일반적으로 10대 후반 내지 20대 초반으로 연장되지 않는다.
- [0205] B형 산필립포 증후군을 겪거나 이에 감수성인 개체를 효과적으로 치료하기 위해 본 발명의 조성물 및 방법을 사용할 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "치료한다" 또는 "치료"는 질환과 관련된 1 이상의 증상의 경감, 질환의 1 이상의 증상의 발병의 예방 또는 지연 및/또는 질환의 1 이상의 증상의 중증도 또는 빈도 감소를 의미한다.
- [0206] 몇몇 실시양태에서, 치료는 B형 산필립포 증후군 환자에서 신경학적 손상의 부분 또는 완전 완화, 경감, 치유, 억제, 발병 지연, 중증도 및/또는 발병 감소를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "신경학적 손상"은 중추 신경계(예를 들면, 뇌 및 척수)의 손상과 관련된 다양한 증상을 포함한다. 신경학적 손상의 증상은 무엇보다도 예를 들면 발육 지연, 진행성 인지 손상, 청각 손실, 언어 발달 손상, 운동 능력 결핍, 활동향진, 공격성 및/또는 수면 장애를 포함할 수 있다.
- [0207] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 치료는 다양한 조직에서(예를 들면, GAG의) 리소좀 저장 감소를 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 치료는 뇌 표적 조직, 척수 뉴런 및/또는 말초 표적 조직에서 리소좀 저장 감소를 의미한다. 특정한 실시양태에서, 리소좀 저장은 대조군과 비교하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 이상 감소한다. 몇몇 실시양태에서, 리소좀 저장은 대조군과 비교하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 감소한다. 몇몇 실시양태에서,

리소좀 저장은 LAMP-1 염색에 의해 결정한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

- [0208] 몇몇 실시양태에서, 치료는 뉴런(예를 들면, 푸르키네 세포를 포함하는 뉴런)에서 액포화 감소를 의미한다. 특정한 실시양태에서, 뉴런에서의 액포화가 대조군과 비교하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 이상 감소한다. 몇몇 실시양태에서, 액포화는 대조군과 비교하여 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 감소한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.
- [0209] 몇몇 실시양태에서, 치료는 다양한 조직에서 NaGlu 효소 활성 증가를 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 치료는 뇌 표적 조직, 척수 뉴런 및/또는 말초 표적 조직에서 NaGlu 효소 활성 증가를 의미한다. 몇몇 실시양태에서, NaGlu 효소 활성은 대조군과 비교하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% 이상 증가한다. 몇몇 실시양태에서, NaGlu 효소 활성은 대조군과 비교하여 적어도 1배, 2배, 3 배, 4배, 5 배, 6배, 7배, 8 배, 9배 또는 10배 증가한다. 몇몇 실시양태에서, NaGlu 효소 활성 증가는 적어도 대략 10nmol/시간/mg, 20nmol/시간/mg, 40nmol/시간/mg, 50nmol/시간/mg, 60nmol/시간/mg, 70nmol/시간/mg, 80nmol/시간/mg, 90nmol/시간/mg, 100nmol/시간/mg, 150nmol/시간/mg, 200nmol/시간/mg, 250nmol/시간/mg, 300nmol/시간/mg, 350nmol/시간/mg, 400nmol/시간/mg, 450nmol/시간/mg, 500nmol/시간/mg, 550nmol/시간/mg, 600nmol/시간/mg 이상이다. 몇몇 실시양태에서, NaGlu 효소 활성은 요추 구역에서 증가한다. 몇몇 실시양태에서, 요추 구역에서의 NaGlu 효소 활성 증가는 적어도 대략 2000nmol/시간/mg, 3000nmol/시간/mg, 4000nmol/시간/mg, 5000nmol/시간/mg, 6000nmol/시간/mg, 7000nmol/시간/mg, 8000nmol/시간/mg, 9000nmol/시간/mg, 10,000nmol/시간/mg 이상이다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.
- [0210] 특정한 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 NaGlu 관련 질환과 관련된 1 이상의 병리학적 또는 생물학적 마커의 존재 또는 대안적으로 축적의 감소(예를 들면, 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상 감소) 또는 완전 제거를 발생시킨다. 이러한 감소 또는 제거는 CNS 의 세포 및 조직(예를 들면, 뉴런 및 희소돌기아교세포)에서 특히 명확할 수 있다. 예를 들면, 몇몇 실시양태에서, 피침체에 투여 시, 본 발명의 약제학적 조성물은 (예를 들면, 대뇌 피질, 소뇌, 미상핵 및 피각, 백질 및/또는 시상에서의) 피침체의 CNS 세포 및 조직에서 생체마커 리소좀 관련 막 단백질 1(LAMP1)의 축적 감소를 나타내거나 성취한다. LAMP1은 리소좀 막에서 고발현된 당단백질이고 이의 존재는 리소좀 저장 장애를 앓는 많은 환자에서 상승된다(Meikle et al., Clin. Chem. (1997) 43: 1325-1335). (예를 들면, LAMP 염색에 의해 결정되는) 리소좀 저장 질환을 앓는 환자에서의 LAMP1의 존재 또는 부재는 따라서 리소좀 저장 질환의 진단 및 모니터링 둘 다를 위한 리소좀 활성의 유용한 표시자 및 마커를 제공할 수 있다.
- [0211] 따라서, 본 발명의 몇몇 실시양태는 NaGlu 관련 질환과 관련된 1종 이상의 병리학적 또는 생물학적 마커의 존재 또는 축적을 감소시키거나 그렇지 않으면 제거하는 방법에 관한 것이다. 유사하게, 본 발명의 몇몇 실시양태는 리소좀 저장 질환과 관련된 1종 이상의 병리학적 또는 생물학적 마커(예를 들면, LAMP1)의 분해(또는 분해 속도)를 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [0212] 몇몇 실시양태에서, 치료는 인지 능력 손실의 진행 감소를 의미한다. 특정한 실시양태에서, 인지 능력 손실의 진행은 대조군과 비교하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 이상 감소한다. 몇몇 실시양태에서, 치료는 발육 지연 감소를 의미한다. 특정한 실시양태에서, 발육 지연은 대조군과 비교하여 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% 이상 감소한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.
- [0213] 몇몇 실시양태에서, 치료는 생존율(예를 들면, 생존율 시간) 증가를 의미한다. 예를 들면, 치료는 환자의 기대 수명 증가를 발생시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 치료가 없는 유사한 질환을 앓는 1명 이상의 대조군 개체의 평균 기대 수명과 비교하여 환자의 기대 수명을 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 100%, 약 105%, 약 110%, 약 115%, 약 120%, 약 125%, 약 130%, 약 135%, 약 140%, 약 145%, 약 150%, 약 155%, 약 160%, 약 165%, 약 170%, 약 175%, 약 180%, 약 185%, 약 190%, 약 195%, 약 200% 이상 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 치료가 없는 유사한 질환을 앓는 1명 이상의 대조군 개체의 평균 기대 수명과 비교하여 환자의 기대 수명을 약 6달, 약 7달, 약 8달, 약 9달, 약 10달, 약 11달, 약

12달, 약 2년, 약 3년, 약 4년, 약 5년, 약 6년, 약 7년, 약 8년, 약 9년, 약 10년 이상 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 치료는 환자의 장기간 생존을 발생시킨다. 본 명세서에 사용되는 용어 "장기간 생존"은 약 40년, 45년, 50년, 55년, 60년 이상의 생존 시간 또는 기대 수명을 의미한다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0214] 본 명세서에 사용된 용어 "개선한다", "증가시킨다" 또는 "감소시킨다"는 대조군과 비교한 값을 나타낸다. 몇몇 실시양태에서, 적합한 대조군은 기준선 측정, 예컨대 본 명세서에 기재된 치료의 개시 전에 동일한 개체에서의 측정, 또는 본 명세서에 기재된 치료의 부재 하의 대조군 개체(또는 복수의 대조군 개체)에서의 측정이다. "대조군 개체"는 (치료된 개체 및 대조군 개체(들)에서의 질환의 병기가 비교되게 보장하도록) 치료되는 개체와 거의 동일한 연령 및/또는 성별인 B형 산필립포 증후군을 앓는 개체이다.

[0215] 치료되는 개체("환자" 또는 "피험체"라고도 칭함)는 B형 산필립포 증후군을 앓거나 B형 산필립포 증후군을 발생시킬 가능성을 갖는 개체(태아, 유아, 어린이, 청소년 또는 성인 인간)이다. 개체는 잔여 내인성 NaGlu 발현 및/또는 활성을 갖거나 측정 가능한 활성을 갖지 않을 수 있다. 예를 들면, B형 산필립포 증후군을 앓는 개체는 정상 NaGlu 발현 수치의 약 30-50% 미만, 약 25-30% 미만, 약 20-25% 미만, 약 15-20% 미만, 약 10-15% 미만, 약 5-10% 미만, 약 0.1-5% 미만인 NaGlu 발현 수치를 가질 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0216] 몇몇 실시양태에서, 개체는 최근에 질환이 진단된 개체이다. 통상적으로, 조기 치료(진단 후 가능한 빨리 치료 시작)는 질환 효과를 최소화하고 치료 이익을 최대화하는 데 중요하다.

[0217] I. 병용 치료

[0218] NaGlu 관련 질환(예를 들면, B형 산필립포 증후군)을 치료하기 위해 재조합 인간 NaGlu 단백질, 예를 들면 충분한 양의 올리고당(예를 들면, 만노스 및 인산화 만노스(즉, M6P))을 포함하는 재조합 인간 NaGlu 단백질을 단독으로 또는 병용하여 사용할 수 있다. 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질은 단독으로 또는 수술 시술과 같은 추가의 시술 또는 치료제와 같은 물질과 병용하여 사용될 수 있고, 추가의 시술 또는 물질은 이의 의도하는 목적을 위해 당업자가 선택하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들면, 추가의 시술 또는 물질은 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질에 의해 치료되는 질환 또는 병증을 치료하는 데 유용한 것으로 분야에서 인정된 치료학적 시술 또는 물질일 수 있다. 추가의 시술 또는 물질은 또한 치료학적 조성물에 유리한 속성을 부여하는 물질, 예를 들면 조성물의 점도에 영향을 미치는 물질일 수 있다.

[0219] 본 발명 내에 포함된 복합제가 이의 의도되는 목적에 유용한 복합제인 것으로 또한 이해되어야 한다. 하기 기재된 물질 및 시술은 예시 목적이 본 발명에 대한 제한으로 의도되지 않는다. 본 발명의 일부인 복합제는 본 발명의 재조합 인간 NaGlu 단백질 및 하기 기재된 적어도 1종의 추가의 물질 또는 시술일 수 있다. 또한 복합제가 형성된 조성물이 이의 의도되는 기능을 수행할 수 있게 하는 경우 복합제는 추가의 1종 초과 물질 또는 시술, 예를 들면, 추가의 2종 또는 3종의 물질을 포함할 수 있다.

[0220] 병용 치료는 수술 시술, 유전자 치료 또는 효소-대체 치료를 포함할 수 있다. 추가로, 재조합 인간 NaGlu 단백질은 비분해성 기질의 축적을 예방 또는 감소(예를 들면, 기질 감소 치료)할 수 있는 1종 이상의 추가의 치료제, 예를 들면, 다른 재조합 단백질 또는 항체 또는 약물과 동시 제제화될 수 있다.

[0221] 1 이상의 실시양태에서, 병용 치료는 하기 더 자세히 기재된 것처럼 면역억제제와의 동시 투여를 포함할 수 있다. 예를 들면, 환자에서 과민증 반응 또는 부작용 면역 반응이 예상되거나 환자가 이를 경험하는 경우 재조합 인간 단백질, 예컨대 재조합 인간 NaGlu 단백질의 투여 전에, 동안에 또는 후에 항히스타민제, 코티코스테로이드, 시클리무스, 보클로스포린, 사이클로스포린, 메토타렉세이트, IL-2 수용체 지시 항체, T 세포 수용체 지시 항체, TNF-알파 지시 항체 또는 융합 단백질(예를 들면, 인플릭시맵, 에타네르셉트 또는 아달리무맵), CTLA-4-Ig(예를 들면, 아바타셉트), 항-OX-40 항체(이들로 제한되지는 않음)를 비롯한 면역억제제를 또한 투여할 수 있다.

[0222] J. 면역원성

[0223] 본 발명의 약제학적 조성물은 이의 관용성을 특징으로 한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "관용성인" 및 "관용성"은 이 조성물이 투여되는 피험체에서 부반응을 야기하지 않거나, 대안적으로 이 조성물이 투여되는 피험체에서 심각한 부반응을 야기하지 않는 본 발명의 약제학적 조성물의 능력을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 이 조성물이 투여되는 피험체에 매우 관용성이다.

- [0224] 일반적으로, 본 발명에 따른 rhNaGlu 단백질의 투여는 피험체에서 중증 부작용을 발생시키지 않는다. 본 명세서에 사용된 중증 부작용은 실질적인 면역 반응, 독성 또는 사망(이들로 제한되지는 않음)을 유발한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "실질적인 면역 반응"은 중증 또는 심각한 면역 반응, 예컨대 후천성 T 세포 면역 반응을 의미한다.
- [0225] 따라서, 많은 실시양태에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 병행 면역억제제 치료(즉, 전치료/전컨디셔닝으로 사용되거나 상기 방법과 동시인 임의의 면역억제제 치료)를 포함하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 치료하는 피험체에서 면역 내성 유발을 포함하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 본 발명의 방법은 T 세포 면역억제제를 사용하는 피험체의 전치료 또는 전컨디셔닝을 포함하지 않는다.
- [0226] 그러나, 몇몇 실시양태에서, 피험체는 본 발명의 rhNaGlu를 투여한 후 면역 반응을 시작한다. 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 rhNaGlu를 투여받는 피험체가 효소 대체 치료에 관용성이 되게 하는 것이 유용할 수 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 방법을 이용하여 면역 내성을 유발할 수 있다. 예를 들면, T 세포 면역억제제, 예컨대 사이클로스포린 A(CsA) 및 항증식제, 예컨대 아자티오프린(Aza)과 함께 저용량의 원하는 대체 효소의 매 주 척추강내 점적의 초기 30-60일 요법을 이용할 수 있다.
- [0227] 본 발명의 병용 치료와 함께 당업자에게 공지된 임의의 면역억제제를 사용할 수 있다. 이러한 면역억제제는 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, CTLA4-Ig 및 항-TNF 물질, 예컨대 에타네르셉트를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다(예를 들면, 문헌[Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potteret et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283] 참조). 이식 환자에서 효과적으로 나타난 항-IL2 수용체( $\alpha$ -아단위) 항체 다클리주맵(예를 들면, 제나팍스(Zenapax)(상표명))을 면역억제제로서 또한 사용할 수 있다(예를 들면, 문헌[Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159] 참조). 추가의 면역억제제는 항-CD2(Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), 항-CD4(Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) 및 항-CD40 리간드(Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0228] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 NaGlu 단백질을 NaGlu 단백질에 대한 면역 반응을 감소시키거나 억제하는 물질, 예를 들면 면역억제제와 동시 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 예를 들면, 환자에서 과민증 반응 또는 부작용 면역 반응이 예상되거나 환자가 이를 경험하는 경우 항히스타민제, 코티코스테로이드, 시몰리무스, 보클로스포린, 사이클로스포린, 메토크세이트, IL-2 수용체 지시 항체, T 세포 수용체 지시 항체, TNF-알파 지시 항체 또는 융합 단백질(예를 들면, 인플릭시맵, 에타네르셉트, 또는 아달리무맵), CTLA-4-Ig(예를 들면, 아바타셉트), 항-OX-40 항체(이들로 제한되지는 않음)와 같은 면역억제제를 또한 제조합 인간 단백질, 예컨대 제조합 인간 NaGlu 단백질의 투여 전에, 동시에 또는 후에 투여할 수 있다.
- [0229] 일 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따라 제조합 단백질의 투여에 의해 발생할 수 있는 임의의 가능한 과민증 반응을 최소화하거나 예방하기 위한 전치료 기술을 제공한다. 일 실시양태에서, 가능한 과민증 반응을 예방하기 위해, 항히스타민제(예를 들면, 다이펜하이드라민)로도 공지된 H-1 수용체 길항제를 환자에게 투여한다. 일 실시양태에서, H-1 수용체 길항제를 체중 1킬로그램당 약 1mg 내지 약 10mg의 용량으로 투여한다. 예를 들면, 항히스타민제를 체중 1킬로그램당 약 5mg의 용량으로 투여할 수 있다. 일 실시양태에서, 항히스타민제를 체중 1킬로그램당 약 0.1mg 내지 약 10mg의 용량으로 투여한다. 일 실시양태에서, 항히스타민제를 체중 1킬로그램당 약 1mg 내지 약 5mg의 용량으로 투여한다. 예를 들면, 용량은 체중 1킬로그램당 1mg, 2mg, 3mg, 4mg 또는 5mg일 수 있다. 항히스타민제를 임의의 유용한 방법에 의해 투여할 수 있다. 일 실시양태에서, 항히스타민제를 정맥내 투여한다. 다른 실시양태에서, 항히스타민제를 약제학적으로 허용되는 캡슐로 투여한다.
- [0230] 항히스타민 투여는 본 발명에 따라 제조합 NaGlu의 투여 전일 수 있다. 일 실시양태에서, 제조합 NaGlu의 투여 약 10 내지 약 90분, 예를 들면, 약 30 내지 약 60분 전에 H-1 수용체 길항제를 투여한다. 혈관 접근 포트에 연



결된 보행 시스템을 이용하여 H-1 수용체 길항제를 투여할 수 있다. 일 실시양태에서, 제조합 NaGlu의 투여 약 90분 전에 항히스타민제를 투여한다. 일 실시양태에서, 제조합 NaGlu의 투여 약 10분 내지 약 60분 전에 항히스타민제를 투여한다. 다른 실시양태에서, 제조합 NaGlu의 투여 약 20분 내지 약 40분 전에 항히스타민제를 투여한다. 예를 들면, 제조합 NaGlu의 투여 20분, 25분, 30분, 35분 또는 40분 전에 항히스타민제를 투여할 수 있다.

[0231] 일 실시양태에서, 투여된 항히스타민제는 다이펜하이드라민이다. 임의의 유용한 항히스타민제를 사용할 수 있다. 이러한 항히스타민제는, 제한 없이, 클레마스틴, 독실아민, 로라티딘, 데스로라티딘, 펙소페나딘, 페니라민, 세티리진, 에바스틴, 프로메타진, 클로르페니라민, 레보세티리진, 올로파타딘, 퀴티아핀, 메클리진, 다이벤하이드리네이트, 엠브라민, 다이메티덴 및 텍스클로로페니라민을 포함한다.

[0232] 다른 실시양태에서, 정맥내 점적과 관련하여, 증가(ramp-up) 프로토콜을 이용하여 점적을 투여하여 과민증 반응에 대한 가능성을 감소시킬 수 있다. 이와 관련하여, 증가 프로토콜은 약제의 점적에 대해 환자를 탈감작시키기 위해 점적 과정에 걸쳐 점적 속도를 천천히 증가시키는 것을 의미한다.

[0233] K. 투여

[0234] 본 발명의 방법은 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 본 발명의 rhNaGlu의 단일 투여 및 다중 투여를 고려한다. 피험체의 병증의 성질, 중등도 및 정도에 따라 규칙적 간격으로 본 발명의 rhNaGlu를 투여할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 규칙적 간격으로 정기적으로(예를 들면, 매년 1회, 6달마다 1회, 5달마다 1회, 3달마다 1회, 2달마다 1회(매 2달 1회), 달마다(매달 1회), 2주마다(매 2주 1회) 또는 주마다) 정맥내 또는 척추강내 치료학적 유효량의 본 발명의 rhNaGlu 단백질을 투여할 수 있다.

[0235] 몇몇 실시양태에서, 다른 투여 경로(예를 들면, 정맥내, 피하, 근육내, 비경구, 경피, 경점막(예를 들면, 경구 또는 비강))와 함께 척추강내 투여를 사용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 2주마다, 달마다, 매 2달 1회, 매 3달 1회, 매 4달 1회, 매 5달 1회, 매 6달 1회, 매년 투여보다 적은 빈도로 다른 투여 경로(예를 들면, 정맥내 투여)를 수행할 수 있다.

[0236] 본 명세서에 사용되는 용어 "치료학적 유효량"은 주로 본 발명의 약제학적 조성물에 포함된 치료제의 전체량에 기초하여 결정된다. 일반적으로, 치료학적 유효량은 피험체에 의미 있는 이점(예를 들면, 기초 질환 또는 병증을 치료, 조절, 치유, 예방 및/또는 경감)을 성취하기에 충분하다. 예를 들면, 치료학적 유효량은 원하는 치료학적 및/또는 예방적 효과를 성취하기에 충분한 양, 예컨대 리소좀 효소 수용체 또는 이의 활성을 조절하여 이러한 리소좀 저장 질환 또는 이의 증상을 치료(예를 들면, 본 발명의 조성물의 피험체에게의 투여 후 "체브라체(zebra body)" 또는 세포 핵포화의 존재 또는 발병의 감소 또는 제거)하기에 충분한 양일 수 있다. 일반적으로, 이를 필요로 하는 피험체에게 투여되는 치료제(예를 들면, 본 발명의 rhNaGlu)의 양은 피험체의 특성에 따라 달라진다. 이러한 특성은 피험체의 증상, 질환 중등도, 일반적인 건강, 연령, 성별 및 체중을 포함한다. 당해 분야의 당업자는 이런 인자 및 다른 관련 인자에 따라 적절한 용량을 쉽게 결정할 수 있다. 또한, 최적 용량 범위를 확인하기 위해 객관적 검정 및 주관적 검정 둘 다를 임의로 이용할 수 있다.

[0237] 다중 단위 용량을 포함할 수 있는 용량 섭생으로 치료학적 유효량을 보통 투여한다. 임의의 특정한 치료학적 단백질의 경우, 치료학적 유효량(및/또는 효과적인 투약 섭생 내의 적절한 단위 용량)은 예를 들면 다른 약제학적 물질과 조합 시 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 또한, 임의의 특정한 환자에 대한 특정한 치료학적 유효량(및/또는 단위 용량)은 치료하고자 하는 질환 및 그 질환의 중등도; 사용되는 특정 약제학적 물질의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별 및 식이; 사용되는 특정 용합 단백질의 투여 시간, 투여 경로 및/또는 배설 속도 또는 대사; 치료 기간을 포함하는 다양한 인자; 및 의학 분야에 널리 공지된 유사 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0238] 몇몇 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 약 0.005mg/kg(체중) 내지 500mg/kg(체중), 예를 들면 약 0.005mg/kg(체중) 내지 400mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 300mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 200mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 100mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 90mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 80mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 70mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 60mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 50mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 40mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 30mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 25mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 20mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 15mg/kg(체중), 약 0.005mg/kg(체중) 내지 10mg/kg(중량) 범위이다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값(예를 들면, 10-50mg/kg, 1-5mg/kg, 2-8mg/kg, 5-10mg/kg, 0.1-10mg/kg,

0.3-30mg/kg, 0.3-50mg/kg, 0.5-10mg/kg, 5-30mg/kg, 또는 6-27mg/kg)이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0239] 몇몇 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 적어도 약 0.1mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 0.2mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 0.3mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 0.4mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 0.5mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 1.0mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 3mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 5mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 6mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 7mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 10mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 15mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 20mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 30mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 40mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 50mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 60mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 70mg/kg(체중) 이상, 적어도 80mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 90mg/kg(체중) 이상, 적어도 약 100mg/kg(체중) 이상이다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0240] 몇몇 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 또한 mg/kg(뇌 중량)로 한정될 수 있다. 당해 분야의 당업자가 이해하는 것처럼, 뇌 중량 및 체중은 상관될 수 있다(예를 들면, 문헌[Dekaban AS. "Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights," Ann Neurol 1978; 4:345-56] 참조).

[0241] 몇몇 실시양태에서, 치료학적 유효 용량은 또한 mg/CSF의 15cc로 한정될 수 있다. 당해 분야의 당업자가 이해하는 것처럼, 뇌 중량 및 체중에 기초한 치료학적 유효 용량은 mg/CSF의 15cc로 전환될 수 있다. 예를 들면, 성인 인간에서의 CSF의 용적은 대략 150ml이다(Johanson CE, *et al.* "Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease," Cerebrospinal Fluid Res. 2008 May 14;5: 10). 따라서, 성인에 대한 0.1mg 내지 50mg의 단백질의 단일 용량 주사는 성인에서 대략 0.01mg/CSF의 15cc(0.1mg) 내지 5.0mg/CSF의 15cc(50mg) 용량이다.

[0242] 임의의 특정한 피험체에 대해, 개체 필요 및 효소 대체 치료제를 투여하거나 이의 투여를 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간에 걸쳐 특정 용량 섭생이 조정되어야 하고, 본 명세서에 기재된 용량 범위가 오직 예시이며 청구된 발명의 범위 또는 실행을 제한하는 것으로 의도되지 않는 것으로 추가로 이해되어야 한다.

[0243] **VIII. 키트**

[0244] 본 발명은 본 발명의 제조합 인간 NaGlu를 포함하고 이의 재구성(동결건조된 경우) 및/또는 사용에 대한 설명서를 제공하는 키트 또는 다른 제조 물품을 추가로 제공한다. 키트 또는 다른 제조 물품은 척추강내 투여 및 관련 수술에 유용한 용기, 카테터 및 임의의 다른 물품, 장치 또는 설비를 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들면 병, 바이알, 주사기(예를 들면, 프리필드 주사기), 앰플, 카트리지, 리저버 또는 리오젝트(lyo-ject)를 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 용기는 프리필드 주사기이다. 적합한 프리필드 주사기는 실리콘 코팅이 소성된 봉규산염 유리 주사기, 실리콘이 분무된 봉규산염 유리 주사기 또는 실리콘이 없는 플라스틱 수지 주사기를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0245] 통상적으로, 용기 위의 또는 이와 관련된 라벨은 사용 및/또는 재구성에 대한 지시를 나타낼 수 있다. 예를 들면, 라벨은 제제가 상기 기재된 단백질 농도로 재구성된다는 것을 나타낼 수 있다. 라벨은 제제가 예를 들면 정맥내 또는 척추강내 투여에 유용하거나 의도된다는 것을 추가로 나타낼 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 용기는 대체 효소(예를 들면, 제조합 NaGlu 단백질)을 포함하는 안정한 제제의 단일 용량을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 안정한 제제의 단일 용량은 약 15ml, 10ml, 5.0ml, 4.0ml, 3.5ml, 3.0ml, 2.5ml, 2.0ml, 1.5ml, 1.0ml 또는 0.5ml 미만의 용적으로 존재한다. 대안적으로, 제제를 보유하는 용기는 제제의 반복 투여(예를 들면, 2-6회 투여)를 허용하는 다중 사용 바이알일 수 있다. 키트 또는 다른 제조 물품은 적합한 희석제(예를 들면, BWF1, 식염수, 완충 식염수)를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 희석제 및 제제의 혼합 시, 재구성 제제 내의 최종 단백질 농도는 일반적으로 적어도 1mg/ml(예를 들면, 적어도 5mg/ml, 적어도 10mg/ml, 적어도 25mg/ml, 적어도 50mg/ml, 적어도 75mg/ml, 적어도 100mg/ml)이다.

[0246] 키트 또는 다른 제조 물품은, 다른 완충제, 희석제, 필터, 침, 카테터, 주사기 및 사용에 대한 지시서를 갖는 패키지 인서트를 포함하는, 상업용 및 사용자 기준으로부터 바람직한 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 기술된 범위 및 값에 중간인 범위 및 값이 본 발명의 일부인 것으로 또한 고려된다.

[0247] **실시예**

[0248] 하기 특정 실시예는 본 발명을 예시하도록 의도되고 특허청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 모든 도면 및 본원에 인용된 모든 참조문헌, 특허 및 공개 특허 출원 및 도면의 내용은 그 전문이 참조문헌으로

본 명세서에 명확히 포함된다.

## 실시예 1

### rhNaGlu의 정제

당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 rhNaGlu 단백질을 정제하였다. rhNaGlu를 포함하는 난백(EW)을 pH 6에서 밤새 가용화시키고 원심분리 및/또는 다층 여과(depth filtration)을 통해 청명하게 하였다. EW를 1M NaOAc 완충제(pH 4)에 의해 pH 6로 조정하였다. 다층 여과 공정의 경우, T2600 필터(Pall(상표명), 40 $\mu$ m)를 제1 여과로 사용하고, 이후 PDF1(Pall(상표명), K200P, 15 $\mu$ m+ EKS, 0.22 $\mu$ m)을 제2 여과 단계로 사용하였다. 필터는 각각의 필터에 대해 60 l의 EW/m<sup>2</sup>의 최적화된 용량을 단일 사용 막이다. 막의 보유 용적은 T2600의 경우 2 l/m<sup>2</sup> 및 PDF1의 경우 4-5 l/m<sup>2</sup>이다. 공정에서, 여과된 EW를 수집하기 전에 보유 용적을 버렸다. 막 보유 용적에 해당하는 완충제(20mM 인산염/137mM NaCl, pH 6)를 사용하여 필터에 남은 EW를 추적하였다.

페닐-HIC(소수성 상호작용 크로마토그래피) 칼럼을 포획 단계로서 적용하였다. 대부분의 난백 단백질이 친수성이므로, 99%의 난백 단백질이 HIC 칼럼을 통해 완전 통과로 통과하였다. rhNaGlu는 페닐-HIC에 더 높은 소수성 결합을 가졌다.

rhNaGlu를 포함하는 난백을 30:1의 비율로 칼럼에 로딩하였다. 완전 로딩 후, 칼럼을 평형 완충제, 5mM 인산염 완충제(pH 6) 및 5mM 트라이스 완충제(pH 7.2)로 세척하였다. rhNaGlu를 30% 프로필렌 글라이콜(pH 7.2)로 용리시켰다. 완전 로딩 후, 칼럼을 평형 완충제 및 5mM 인산염 완충제(pH 6)로 세척하였다. rhNaGlu를 5mM 트라이스 완충제(pH 7.2)와 함께 30% 프로필렌 글라이콜로 용리시켰다. 칼럼 결합 용적은 대략 4.5mg/ml이다. 페닐-HIC 칼럼을 통한 rhNaGlu의 순도는 95% 초과(950배 증가)에 도달하였다. 회수는 30%의 프로필렌 글라이콜 용리로 대략 80%이다.

용리된 rhNaGlu 분획을 1M 아세트산으로 pH 5로 조정한 후 기가캡(GigaCap) S 칼럼(EW: 칼럼 크기 = 10:1)에 로딩하였다. 칼럼을 50mM NaOAc 완충제(pH 5)와 평형시켰다. 완전 로딩 후, 칼럼을 평형 완충제로 세척한다. rhNaGlu를 50mM NaOAc/60mM NaCl(pH 5)로 용리시켰다.

정제된 rhNaGlu를 사용하여 단백질 특성을 수행하였다. SDS-PAGE(도 6)에서 난백으로부터 정제된 rhNaGlu의 분자량(약 90kDa)을 분석하였다. 난백 내의 rhNaGlu의 평균 발현 수치가 도 7에 도시되어 있다. 형질전환 조류로부터 생성된 rhNaGlu의 특성이 표 2에 요약되어 있다.

표 2

	rhNaGlu (칼루스)
겉보기 분자량	~90 kDa
pI	6.1-6.9
pH 안정성	pH 5-8
난백에서의 안정성	> 50 일

## 실시예 2

### 난백에서의 rhNaGlu의 안정성

단일 알을 부화 7일 후 부수고 활성에 대해 분석하였다. 내용물을 반분으로 나누고 각각의 반분을 표준 난백 청명화 처리하였다. 비처리 및 청명한 난백 둘 다를 분취하고 효소 활성 안정성을 위해 4℃ 및 -20℃에서 저장한다. 난백에서의 rhNaGlu는 적어도 50일까지 안정한 효소 활성을 나타냈다.

냉동/해동 사이클 안정성을 평가하였다. 정제된 rhNaGlu를 10초 동안 액체 질소에서 냉동시키고 37℃에서 2분 동안 해동시켰다. 효소 활성은 10회 사이클 동안 변화를 나타내지 않았다.

정제된 rhNaGlu를 상이한 pH 완충제로 투석하여 순수한 효소의 안정성을 측정하였다. 결과는 순수한 rhNaGlu가 12일 동안 pH 5 내지 8에서 안정하다는 것을 나타낸다.

## 실시예 3

- [0263] 올리고당 프로파일링
- [0264] 만노스-6-포스페이트(M6P)는 당단백질의 3차 구조의 중요한 부분이고, 당단백질의 최종 올리고당에 통합될 때, 세포 표면에 존재하는 M6P 수용체에 의해 인식되어 이에 결합되어, 이후 리소좀으로의 내재화를 허용하는 N-연결 올리고당의 말단 단당류이다. 따라서, M6P는 당단백질을 리소좀에 표적화하기 위한 효과적인 에피토프이다.
- [0265] 단백질 글라이코실화의 분석은 당단백질 특성의 중요한 부분이다. 올리고당은 O-연결 글라이칸으로서 세린 또는 트레오닌을 통해 또는 N-연결 글라이칸으로서 아스파라긴을 통해 단백질에 연결될 수 있다.
- [0266] 올리고당의 구조를 분석하기 위해, 다양한 크로마토그래피 및 분광학 기법을 수행하였다. 펄스 적류측정법 검출(HPAEC-PAD)에 의한 고성능 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하였다. 이 기법을 이용하여, 올리고당을 전하에 기초한 일반 기(즉, 중성, 단일 하전 또는 다중 하전)로 신속히 분리하고 이의 구조를 순수한 표준품과 비교하여 결정하였다.
- [0267] 모든 방법은 하디(Hardy) 및 타운젠트(Townsend)(Hardy, M. R., and Townsend, R. R., "High-pH anion-exchange chromatography of glycoprotein-derived carbohydrates", 1994, *Methods Enzymol.* 230: 208-225)가 기술한 프로토콜에 기초하였다. 형질전환 조류 유래 rhNaGlu의 정제된 샘플을 4℃에서 약 24시간 동안 나노순수 물에 대해 관-O-투석기(Tube-O-Dialyzer)를 사용하여 투석하여 염 및 다른 오염물질을 제거하였다. 나노순수 물을 전체 투석 기간 동안 4회 대체하였다. 투석 후, 각각의 샘플을 3 분취량으로 나눴다. 천연 및 아미노 당 분석에 의도되는 분취량을 100℃에서 4시간 동안 2N 트라이플루오로아세트산(TFA)으로 가수분해하고, 만노스-6-포스페이트 분석을 위한 분취량을 100℃에서 1.5시간 동안 6.75N TFA로 가수분해하였다. 이후, 가수분해물을 N<sub>2</sub> 하에 건조시키고, 50μl H<sub>2</sub>O로 재용해시키고, 7분 동안 얼음 위에서 음파처리하고 주사 바이알로 옮겼다.
- [0268] 공지된 수의 물의 천연 및 아미노 당 및 만노스-6-포스페이트에 대한 표준품의 혼합물을 샘플과 동시에 동일한 방식으로 가수분해하였다. 4의 상이한 농도의 천연 및 아미노 당 표준 혼합물 및 만노스-6-포스페이트를 준비하여 보정 방정식을 확립하였다. 샘플 내의 각각의 당의 몰수를 보정 방정식으로부터 선형 보간법에 의해 정량화하였다.
- [0269] HPAEC-PAD에 의해 올리고당 프로파일 및 만노스-6-포스페이트 프로파일을 별개로 분석하였다. 다이오넥스 크로멜레온(Dionex chromeleon) 소프트웨어를 사용하여 기기 제어 및 데이터 획득을 성취하였다. 가수분해된 rhNaGlu의 HPAEC-PAD 분석은 M6P를 검출하였다. M6P의 평균 측정량은 210μg의 가수분해 단백질마다 3.8μg(CV 3.7%)이었다. 몰로의 전환으로 단백질 1몰당 3.2몰의 M6P의 비에 해당하는 단백질 2.8nmol당 13.4nmol의 M6P를 생성하였다.
- [0270] HPAEC-PAD를 사용하여 rhNaGlu(갈루스)에 대해 올리고당 프로파일을 또한 얻었다(도 8 참조). 이 프로파일은 단일 샘플에서 PNGase F 반응의 우수한 반복성을 나타낸다. 천연 올리고당(약 10분 내지 약 20분)에 상응하는 구역에서 피크 클러스터가 관찰되었다. 약 25분 내지 약 35분 사이에 용리하는 유의적으로 더 작은 피크의 그룹이 또한 관찰되었고, 이는 아마도 단일 하전 중에 기여한다.
- [0271] 형질전환 조류(갈루스)로부터 생성된 rhNaGlu의 샘플로부터 얻은 단당류 조성물 분석 결과가 표 3에 요약되어 있고, 이 표에는 rhNaGlu에 대해 분석된 각각의 단당류의 평균 몰비가 기재되어 있다.

표 3

rhNaGlu(갈루스) 중의 단당류 몰비

N-아세틸갈락토사민(GalNAc)	1.1 <sup>*</sup>
N-아세틸글루코사민(GlcNAc)	35.6 <sup>*</sup>
갈락토스(Gal)	4 <sup>*</sup>
만노스(Man)	25.5 <sup>*</sup>
만노스-6-포스페이트(M6P)	3.2 <sup>*</sup>
푸코스	미검출
글루코스	미검출

<sup>\*</sup> 단백질 1몰당 단당류의 몰

[0272]



[0273] **실시예 4**

[0274] **섬유아세포로의 세포 흡수**

[0275] 야생형 인간 섬유아세포 및 III B형 점액 다당류증(NaGlu 결핍) 인간 섬유아세포를 24웰 플레이트(웰당  $2.5 \times 10^4$  개의 세포) 내에 위치시키고 5% CO<sub>2</sub> 중에 37℃에서 밤새 항온처리하였다. 섬유아세포 기본 배지를 포함하는 순화 배지 및 적은 혈청을 갖는 섬유아세포 성장 키트를 사용하였다. 다양한 양의 rhNaGlu(30, 10, 3.0, 1.0, 0.3 및 0 µg/ml)를 5% CO<sub>2</sub> 중에 37℃에서 24시간 동안 동시 항온처리하여 인간 섬유아세포에 의한 세포 흡수 수치를 결정하였다(도 9 참조). 웰을 PBS로 3회 세척하였다. 100 µl 용해 완충제를 웰마다 첨가하고 플레이트를 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다. 세포 용해물을 1.5ml 원심분리 관에 옮겼다. 냉동 및 해동의 1회 사이클을 수행하였다. 세포 용해물을 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 검정에 25 µl 상청액을 사용하였다. 검정 시간은 2시간이었다. 당해 분야에 공지된 방법 및 문헌[Marsh *et al.*, *Clinical Genetics* (1985) 27: 258-262, Chow *et al.*, *Carbohydrate Research* (1981) 96:87-93; Weber *et al.*, *Protein Expression and Purification*, (2001) 21:251-259]에 기재된 방법에 따라 효소 활성을 측정하였다.

[0276] 도 9에 도시된 바대로, 음성 대조군(즉, IIIB형 MPS)은 임의의 NaGlu 활성을 나타내지 않았고, 양성 대조군(즉, 야생형 인간 섬유아세포)은 NaGlu 활성을 나타냈다. 0.3 µg/ml의 rhNaGlu로 처리된 IIIB형 MPS 세포는 야생형 섬유아세포 세포에서 관찰된 정상 활성 수치의 대략 50%를 나타냈다. 1 µg/ml의 rhNaGlu로 처리된 IIIB형 MPS 세포는 야생형 세포에서 관찰된 것보다 대략 4배 높은 NaGlu 활성을 나타냈다. 놀랍게도, 30 µg/ml의 rhNaGlu로 처리된 IIIB형 MPS 세포는 야생형 세포에서 관찰된 것보다 적어도 40배 높은 NaGlu 활성을 나타냈다. 이 결과는 형질전환 조류(갈루스)로부터 생성된 rhNaGlu가 높은 수치에서 인간 섬유아세포로 효과적으로 내재화된다는 것을 나타낸다.

[0277] rhNaGlu의 내재화가 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 일어나는지를 결정하기 위해, M6P 억제 검정을 수행하였다. M6P 억제 검정을 위해, 다양한 농도의 자유 M6P를 30 µg/ml의 rhNaGlu로 처리된 인간 IIIB형 MPS 섬유아세포에 첨가하고 효소 활성을 상기 기재된 바대로 측정하였다. 도 10에 도시된 것처럼, 인간 IIIB형 MPS 섬유아세포는 임의의 NaGlu 활성을 나타내지 않아, 자유 M6P에 의한 NaGlu 흡수의 효과적인 억제를 제시한다. 반대로, 자유 M6P의 부재 하에 30 µg/ml의 rhNaGlu로 처리된 MPSIII 섬유아세포는 높은 수치의 효소 활성을 나타내어, 단백질이 NaGlu 결핍 섬유아세포로 효과적으로 내재화되고 활성을 보유한다는 것을 제시한다. 이 효소 활성은 0.03mM 이상의 농도에서 배지 중의 M6P 당당류의 존재에 의해 억제되었다. 순화 배지 중의 1mM의 M6P 당당류의 존재는 단백질의 세포 흡수의 90% 초과를 억제하였다.

[0278] 이 결과는 형질전환 조류로부터 생성된 rhNaGlu가 M6P 수용체 매개 엔도사이토시스를 통해 IIIB형 MPS 섬유아세포로 효과적으로 내재화되고 rhNaGlu가 수용체 인식을 위해 M6P 당당류와 경쟁한다는 것을 나타낸다. 이 결과는 형질전환 조류로부터 생성된 rhNaGlu에서 M6P 구조의 존재를 나타내는 글라이칸 분석과 일치하였다.

[0279] **실시예 5**

[0280] **활성 NaGlu 융합 단백질의 생성**

[0281] 조류 발현계에서 rhNaGlu 융합 단백질을 발현하는 실험성을 검정하도록 2개의 상이한 rhNaGlu 융합 구성체를 설계하였다.

[0282] 1개의 구성체에서, 8개의 연속 아스파르트산 잔기를 코딩하는 핵산 서열(DDDDDDDD)을 종래 PCR 및 DNA 재조합 기술을 이용하여 전장 NaGlu cDNA 서열(서열 번호 2)의 5' 말단에서 NaGlu 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 융합하였다. 다른 구성체에서, TfRL을 코딩하는 핵산 서열(즉, THRPPMWSVPWP; 서열 번호 5)을 전장 NaGlu cDNA 서열의 3' 말단에서 NaGlu를 코딩하는 핵산 서열에 융합하였다. 각각의 구성체를 EcoRI 및 HindIII 제한 자리를 사용하여 pTT22 발현 벡터에 삽입하였다. 생성된 벡터를 각각 인간 배아 신장(HEK) 293 세포로 형질감염시키고 높은 수치의 융합 NaGlu 단백질을 발현하는 안정한 클론을 얻었다. N 말단(AAA-NaGlu)에서 8개의 연속 아스파르트산 잔기의 스트레치에 융합된 rhNaGlu 단백질 및 C 말단(NaGlu-TfRL)에서 트랜스페린 수용체 리간드(TfRL)에 융합된 rhNaGlu 단백질을 순화 배지로부터 분리하였다.

[0283] 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 AAA-NaGlu 및 NaGlu-TfRL의 효소 활성을 측정하였다(예를 들면, 문헌 [Marsh *et al.*, *Clinical Genetics* (1985) 27:258-262; Chow *et al.*, *Carbohydrate Research*, (1981) 96:87-93; Weber *et al.*, *Protein Expression and Purification* (2001) 21 :251-259; Neufeld *et al.*, *Protein Expression and Purification* (2000) 19:202-211; 및 Weber *et al.*, *Human Molecular Genetics* (1996) 5:771-

777] 참조).

[0284] 도 13 및 도 14에 도시된 것처럼, HEK293 세포로부터 생성된 AAA-NaGlu 및 NaGlu-TfRL 융합 단백질은 높은 수치의 효소 활성을 나타냈다. 이 결과는 형질전환 조류 발현계로부터의 효소 활성을 보유하면서 인산화 만노스 수치가 증가한 NaGlu 융합 단백질을 생성하기 위해 이 구성체를 사용할 수 있다는 가능성을 확인시켜준다.

#### [0285] 실시예 6

##### [0286] 대식세포로의 세포 흡수

[0287] 갈루스로부터 생성된 rhNaGlu의 인간 대식세포 세포로의 내재화를 또한 측정하였다. NR8383 대식세포 세포를 5% CO<sub>2</sub> 중에 37°C에서 0, 4, 8, 24, 32 및 48시간 동안 F12 성장 배지 중의 10μg/ml의 rhNaGlu와 함께 처리하였다.

샘플을 회수하고 PBS로 세척한 후 용해시켰다. 2.5x10<sup>5</sup>개의 세포를 1ml의 용해 완충제(10mM의 인산Na(pH 6.0), 0.05% NP40) 중에 용해시키고, 용해물을 1.5ml의 원심분리 관에 옮기고 10,000rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 단백질 농도를 브래드포드 검정에 의해 결정하고 NaGlu 효소 검정을 위해 분취량을 냉동시켰다.

[0288] 표준 방법을 이용하여 효소 활성을 측정하였다. 25mM의 기질 (4-메틸룸베틸리페릴 2-아세타미도-2-데옥시-a-D-글루코피라노사이드)를 나노순수 물 중에 2mM로 희석하여 워킹 기질 스톱을 형성하였다. 샘플 희석액을 검정 완충제(1% 소 혈청 알부민) 중에 준비하였다. 25μl의 200mM 아세트산나트륨을 멀티 웰 플레이트의 웰에 분배하였다. 25μl의 표준품 및 25μl의 샘플을 지정된 웰에 첨가하였다. 50μl의 워킹 기질 스톱을 각각의 웰에 첨가하고 플레이트를 혼합되도록 약하게 두드렸다. 플레이트를 접착 필름으로 밀봉하고 37°C에서 30분 동안 함께 처리하였다. 이후, 50μl의 중지 용액(1M 글라이신(pH 12.5))을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 플레이트를 형광 바닥을 이용하는 마이크로플레이트에 위치시키고 360nm 여기 및 460nm 방출에서 강도를 측정하였다. 0.25mM, 0.125mM, 0.0625mM, 0.0312mM, 0.0156mM 및 0.0078mM에서의 4-MU의 표준품과 비교하여 방출된 4-메틸룸베틸리페론(4-MU)의 수치를 측정하였다.

[0289] 도 15에 도시된 바대로, 10μg/ml의 rhNaGlu와 함께 처리된 대식세포에서의 NaGlu 활성 수치는 48시간 기간 거의 직선으로 증가하였다: 대식세포에 의한 rhNaGlu 흡수는 다소 느리지만, 측정된 전체 기간에 걸쳐 일정하였다. (글라이코실화 구조에서 M6P 및/또는 만노스를 포함하는 다른 리소좀 효소와 비교하여) NaGlu 활성의 비교적 느린 연장 흡수가 예상되지 못했고 놀라웠다. 다량의 rhNaGlu 단백질이 연장 기간 동안 대식세포로 채워져, rhNaGlu에 노출되지 않은 야생형 대식세포에서 관찰된 기초 수치보다 적어도 10배, 50배, 100배, 200배, 300배, 500배 또는 심지어 1,000배 높은 세포내 효소 활성 수치를 발생시킨다는 것이 똑같이 놀랍고 예상되지 못했다. 이 결과는 rhNaGlu 및 세포내 환경이 세포의 극도로 안정하다는 것을 나타낸다. 추가로, 이 결과는 rhNaGlu가 생체내 더 긴 혈청 반감기(예를 들면, 더 긴 순환) 및 높은 혈청 농도를 허용하는 물리화학적 특성(이 특성은 중추 신경계(CNS)로의 흡수 증대에 이상적임)을 보유할 수 있다는 것을 제시한다.

### 표 4

NaGlu 특성의 요약

	조류(갈루스) 생성 rhNaGlu	천연 인간 NaGlu	CHO 생성 인간 NaGlu
겉보기 분자량 (kDa)	~85 - ~90	~86	~79 - ~89
효소 활성 (nmol/분/mg)	>1,000	~500	~1,057
만노스-6-포스페이트	높음	높음	없거나 매우 낮음

[0290]

#### [0291] 실시예 7

##### [0292] NaGlu 결핍 마우스로의 rhNaGlu의 투여

[0293] 균주 B6.129S6-NaGlu<sup>tm1Efn</sup>/J의 번식 쌍으로부터 동형접합 null 마우스를 생성하였다. 동일한 방식으로 대조군 야생

형 마우스를 생성하였다. 표준 PCR 프로토콜에 따라 유전자형분석을 수행하였다. 출생 시 동형접합 *naglu*<sup>-/-</sup> 늑 마우스가 생존 가능하고 크기가 정상이며 임의의 중대한 신체 또는 행동 비정상을 나타내지 않더라도 모든 조직에서 NaGlu를 나타내지 않는다고 당해 분야에서 기술된다(문헌[Li et al., (1999) *Proc., Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14505-14510] 참조). 1월령에서, 대부분의 조직에서 공포 대식세포가 발견되었다. 신장에서의 상피 세포 및 몇몇 뇌 부분에서의 뉴런이 또한 이환되었다. 공포는 연령에 따라 더 현저해졌다. 4달 내지 5달에서, 마우스는 오픈 필드 시험에서 비정상 거동을 나타냈다. 더 늙은 동물이 요폐를 갖고 걷는 것이 어려울 수 있다. 동형접합 늑 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 통상적인 수명은 8달 내지 12달이었다(문헌[Li et al., (1999) *Proc., Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14505-14510] 참조).

#### [0294] 정맥내(IV) 투여

[0295] 꼬리 정맥 주사에 의한 시험 물품 및 비히클의 정맥내 투여를 하기와 같이 성취하였다. 주사 전에 동물을 백열등으로 따뜻하게 하거나 꼬리를 대략 43℃의 따뜻한 물에 넣어 혈관확장을 성취하였다. 이후, 동물을 통제 장치에 위치시켰다. 꼬리 표면을 주사 전에 70% 아이소프로판올로 소독하였다. 꼬리의 측정맥을 바로 피부 밑에 위치시키고 인장을 가하여 꼬리의 먼 부분에서 확인하였다. 27G 바늘 바벨 업(bevel up)을 3 내지 4mm에 대해 정맥에 삽입하였다. 이후, 투여된 액체가 금방 혈관 공간을 점유하면서, 관찰된 정맥 청소에 의해 입증된 10초 동안 지속 볼루스 주사로서 시험 물품 또는 비히클을 투여하였다. 바늘 제거 후, 압력을 약하게 천자 자리에 가하여 지혈을 제공하였다. 정상 활성을 보장하기 위해 시술 직후 동물을 모니터링하였다.

#### [0296] 척추강내(IT) 투여

[0297] 요추 천자 주사에 의한 시험 물품 및 비히클의 척추강내 투여를 하기와 같이 성취하였다. 주사 전에, 동물을 시술 동안 노즈 콘(nose cone)을 통해 유지되는 아이소플루란을 사용하여 마취시켰다. 각각의 주사 전에 필요한 대로 털을 깎아 주사 자리를 준비하였다. 동물을 플랫폼에 엎드린 위치로 놓아 뒷다리가 동물의 등의 볼록한 곡선을 형성하는 플랫폼에 벌리고 올라앉도록 보장하였다. 등의 표면을 70% 아이소프로판올로 문지르고 주사 전에 건조시켰다. 척추 및 관골이 L4-L5 또는 L5-L6 여백에 위치하도록 촉진하였다. 두개용 30G 바늘 바벨 업을 추간 공간에 삽입하였다. 꼬리 회피 관찰에 의해 위치를 확인하였다. 이후, 시험 물품 또는 비히클을 볼루스 주사로서 투여하였다. 동물을 마취로부터 회복시키고 정상 활성 및 사지 사용을 보장하기 위해 시술 직후 모니터링하였다.

#### [0298] 결과

[0299] (각각 1.125 또는 4.5mg/ml의 rhNaGlu 농도에서) 총 5 용량에 대해 격일로 꼬리 정맥 주사(IV 투여)를 통해 6.75 또는 27mg/kg의 용량 수치로 12주령 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스(B6.129S6-*Naglu*<sup>tm1Efn</sup>/J)에 rhNaGlu(갈루스)를 투여하였다. 유사하게, 1.54mg/ml의 NaGlu 농도에서 총 5 용량에 대해 격일로 요추 천자 주사(IT 투여)를 통해 0.31mg/kg의 용량 수치로 12주령 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스에 rhNaGlu(갈루스)를 투여하였다. 격일로 5 용량에 대해 동일한 용량 농도로 비히클(10mM 인산염 완충제, 150mM NaCl 및 0.02% 트윈(Tween)80(pH 5.5-5.8))을 *naglu*<sup>-/-</sup> 녀아웃 마우스에 투여하였다. 연구 기간 동안 비처리 야생형 및 *naglu*<sup>-/-</sup> 녀아웃 마우스를 또한 유지시켰다.

[0300] 5회 주사 및 최종 주사 4시간 후 동물을 희생시켰다. 모든 동물을 부검하고 간, 뇌, 비장, 심장, 폐 및 신장을 절제하였다. 각각의 장치를 비슷하게 나눠 냉동 저장(-80℃) 및 포르말린 고정 저장 둘 다를 위한 샘플을 제공하였다.

[0301] (1) 황산헤파란 다이사카라이드의 SAX-HPLC 분석에 기초한 분석 방법을 이용하는 황산헤파란 농도; 및 (2) 세포 기반 효소 활성 검정을 이용하는 α-N-아세틸글루코사미니다제 효소 활성에 대해 조직 샘플을 분석하였다.

[0302] 뇌, 간, 신장, 비장, 심장 및 폐 조직의 병리조직학적 평가를 포르말린 고정 조직 샘플을 사용하여 수행하고 파라핀에 포매하고 4μm로 절개하고 유리 슬라이드에 탑재하고 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다.

[0303] 6.25 및 27mg/kg(체중)의 용량 수치에서 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스에 대한 rhNaglu(갈루스)의 정맥내 반복 투여(10일 기간 동안 5 용량) 후, *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌, 간 및 신장에서 명확한 용량 의존 황산헤파란 농도 감소가 있었다(표 5; 도 16-18). 정맥내 투여 후 상대 α-N-아세틸글루코사미니다제 활성이 뇌 및 간에서 증가하였다(표 6). NaGlu 효소 활성 및 생성된 기질 청소가 IV 투여로 치료된 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌에서 관찰되어, 전신 투여된

rhNaGlu(갈루스)가 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌에 분포되고 혈액 뇌 장벽(BBB)의 존재에도 불구하고 효능을 발휘하는데 효과적이라는 것을 제시하므로, 이 결과는 예상되지 못했고 놀라웠다.

[0304]

0.31mg/kg의 용량 수치에서 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스에 대한 rhNaGlu(갈루스)의 척추강내 투여(10일 기간 동안 5 용량) 후, *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌에서 황산헤파란 농도가 감소하여(표 5; 도 19), rhNaGlu(갈루스)가 뇌에 표적화되고 *naglu*<sup>-/-</sup> 마우스의 뇌에서 기질 축적을 감소시키는 데 효과적이라는 것을 제시한다.

표 5

조직 기질 수치(rhNaGlu 갈루스)

조직	동물 수	유전자형	희생 시 연령 (주령)	치료	용량 (mg/kg)	경로	황산 헤파란 ug/mg (조직)	평균	sd
신장	253	WT	4	na	-	-	0.1		
	155	WT	12	na	-	-	0.045	0.0725	0.038891
	178	KO	12	na	-	-	1.882		
	242	KO	4	na	-	-	1.687		
	145	KO	13	na	-	-	1.904		
	474	KO	13	비히클	0	IV	1.501		
	479	KO	13	비히클	0	IV	1.983		
	484	KO	13	비히클	0	IV	1.839	1.799333	0.175908
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.928		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.737	0.8325	0.135057
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.591		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.311		
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.585	0.495667	0.159954
	86	KO	15	vehicle	0	IT	2.105		
	91	KO	14	vehicle	0	IT	1.704	1.9045	0.28355
	94	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	1.324		
	101	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	2.233	1.7785	0.64276
간	253	WT	4	na	-	-	0.045		
	155	WT	12	na	-	-	0.092	0.0685	0.033234
	243	WT	4	na	-	-	0.045		
	178	KO	12	na	-	-	1.85		
	242	KO	4	na	-	-	2.263	2.0565	0.292035
	255	KO	4	na	-	-	1.85		
	474	KO	13	vehicle	0	IV	1.822		
	479	KO	13	vehicle	0	IV	1.981		
	484	KO	13	vehicle	0	IV	2.004	1.961667	0.165779
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.748		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.444		
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.494	0.562	0.163009
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.491		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.172	0.3315	0.225567

[0305]

녀	253	WT	4	na	-	-	0.021		
	155	WT	12	na	-	-	0.013		
	243	WT	4	na	-	-	0.014308		
	10	WT	36	na	-	-	0.012649	0.015239	0.003906
	239	KO	4	na	-	-	0.095		
	178	KO	12	na	-	-	0.084		
	242	KO	4	na	-	-	0.099		
	255	KO	4	na	-	-	0.094538		
	165	KO	24	na	-	-	0.084015		
	474	KO	13	비히클	0	IV	0.085447		
	479	KO	13	비히클	0	IV	0.072		
	484	KO	13	비히클	0	IV	0.073	0.085875	0.009972
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.045		
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044119		
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	0.044	0.044373	0.000546
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.017796		
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.016668		
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	0.028	0.020821	0.006242
	86	KO	15	비히클	0	IT	0.094521		
	91	KO	14	비히클	0	IT	0.072623	0.083572	0.015484
	94	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.038866		
	101	KO	14	rhNaGlu	0.31	IT	0.028229	0.033548	0.007521

na: 이용 불가능(마우스는 비치료).

[0306]



표 6

조직 효소 활성(rhNaGlu 칼루스; U/ng 단백질)

조직	동물 수	유전자형	희생 시 연령 (주령)	치료	용량 (mg/kg)	경로	효소 활성 (U/ng (단백질))
뇌	253	WT	4	na	-	-	7.7
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	비히클	0	IV	0
	479	KO	13	비히클	0	IV	0
	484	KO	13	비히클	0	IV	0.575
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	10.58
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	5.066666667
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	4.033333333
	481	KO	13	rhNaglu	27	IV	87.91666667
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	90.15
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	17.35
간	253	WT	4	na	-	-	36.69
	178	KO	12	na	-	-	0
	474	KO	13	비히클	0	IV	0
	479	KO	13	비히클	0	IV	0
	484	KO	13	비히클	0	IV	0
	487	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	512.92
	492	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	378.805
	504	KO	13	rhNaGlu	6.25	IV	607.9225
	481	KO	13	rhNaGlu	27	IV	659.6825
	485	KO	13	rhNaGlu	27	IV	654.2475
	490	KO	13	rhNaGlu	27	IV	677.8725

na: 이용 불가능(마우스는 비치료).

[0307]

[0308]

상기 명세서에서의 각각의 실시예는 본 발명의 제한이 아니라 본 발명의 설명의 방식으로 제공된다. 사실, 본 발명의 범위 또는 정신을 벗어남이 없이 본 발명에 다양한 변형, 조합, 첨가, 결실 및 변화가 이루어질 수 있다는 것이 당해 분야의 당업자에게 명확하다. 예를 들면, 다른 추가의 실시양태를 생성하기 위해 다른 실시양태에서 일 실시양태의 부분으로서 예시되거나 기재된 특징이 사용될 수 있다. 본 발명은 이러한 변형, 조합, 첨가, 결실 및 변화를 포괄하도록 의도된다.

[0309]

각각의 개별적인 공보, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트 또는 수탁 번호/데이터염기 서열이 이렇게 참조문헌으로 포함되도록 특별히 개별적으로 나타낸 정도와 동일한 정도로 본 명세서에 인용된 모든 공보, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트 및 수탁 번호/데이터염기 서열(폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열 둘 다 포함)이 모든 목적을 위해 그 전문이 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

도면

도면1

인간 NaGlu 아미노산 서열(신호 펩타이드: 1-23번, 밑줄침)

<u>MEAVAVAAAV</u> <u>GVL</u> <u>LLAGAGG</u> <u>AAG</u> DEAREAA AVRALVARLL GPGPAADFSV SVERALAACP	60
GLDTYSLGGG GAARVRVRGS TGVAAGAGLH RYLRFDCGCH VAWSGSQLRL PRPLPAVPGE	120
LTEATPNRYR YYQNVCTQSY SFVWWDWARW EREIDWMALN GINLALAWSG QEAIWQRVYL	180
ALGLTQAEIN EFFTGPAPLA WGRMGNLHTW DGPLPPSWHI KQLYLQHRVL DQMRSPGMTF	240
VLPAPAGHVP EAVTRVFPQV NVTKMGSWGH FNCSYSCSFL LAPEDPIFPI IGSLFLRELI	300
KEFGTDHIYG ADTFNEMQPP SSEPSYLAAA TTAVYEAMTA VDTEAVWLLQ GWLFQHQPQF	360
WGPAQIRAVL GAVPRGRLLV LDLFAESQPV YTRTASFQGG PFIWCMLHNF GGNHGLFGAL	420
EAVNGGPEAA RLFPNSTMVG TGMAPEGISQ NEVVYSLMAE LGWRKDPVPD LAAWVTSFAA	480
RRYGVSHPPA GAAWRLLLRS VYNCSGEACR GHNRSPLVRR PSLQMNTSIW YNRSDVFEAW	540
RLLLTSAFSL ATSPAIFYDL LDLTRQAVQE LVSLYEEAR SAYLSKELAS LLRAGGVLAY	600
ELLPALDEVL ASDSRFLLGS WLEQARAAAV SEAEADFYEQ NSRYQLTLWG PEGNILDYAN	660
KQLAGLVANY YTPRWRLFLE ALVDSVAQGI PFQHQHFDKN VFQLEQAFVL SKQRYPSQPR	720
GDIVDLAKKI FLKYYPRWVA GSW	743

(서열 번호 1)

도면2

인간 NaGlu 코딩 서열(cDNA)

atggaggcgg	tggcgggtgg	cgcggcgggtg	ggggtccttc	tcctggccgg	ggccggggggc	60
gcggcaggcg	acgaggcccg	ggaggcggcg	gocgtgcggg	cgctcgtggc	cggctgctg	120
gggccaggcc	ccgcggccga	cttctccgtg	tcggtaggagc	gcgctctggc	tgccaagccg	180
ggcttggaca	cctacagcct	gggcggcggc	ggcgcgccgc	gcgtgcgggt	gcgcggctcc	240
acgggcgtgg	cagccgcgcg	ggggctgcac	cgctacctgc	gcgacttctg	tggctgccac	300
gtggcctgg	cggctctca	gctgcgcctg	ccgcggccac	tgccagcccg	gccgggggag	360
ctgaccgagg	ccacgcccaa	caggtaccgc	tattaccaga	atgtgtgcac	gcaaagctac	420
tctttcgtgt	ggtgggactg	ggcccgggtg	gagcgagaga	tagactggat	ggcgtgaat	480
ggcatcaacc	tggcactggc	atggagcggc	caggaggcca	tctggcagcg	ggtgtacctg	540
gccttggggc	tgccccaggc	agagatcaat	gagttcttta	ctggtcctgc	cttcttggca	600
tgggggcgaa	tgggcaacct	gcacacctgg	gatggccccc	tgccccctc	ctggcacatc	660
aagcagcttt	atctgcagca	ccgggtcctg	gaccagatgc	gctccttcgg	catgaccca	720
gtgtgcctg	cattcgcggg	gcatgttccc	gaggtgttca	ccagggtgtt	ccctcaggtc	780
aatgtcacga	agatgggcag	ttggggccac	tttaactgtt	cctactcctg	ctccttcttt	840
ctggctccgg	aagaccccat	attccccatc	atcgggagcc	tcttcttgcg	agagctgac	900
aaagagtttg	gcacagacca	catctatggg	gcccagacatt	tcaatgagat	gcagccacct	960
tcctcagagc	cctcctatct	tgcccgagcc	accactgccc	tctatgaggc	catgactgca	1020
gttgatactg	aggctgtgtg	gctgtctcaa	ggctggctct	tccagaccca	gccgcagttc	1080
tggggggccg	cccagatcag	ggctgtgtg	ggagctgtgc	cccgtggccg	cctcctgggt	1140
ctggacctgt	ttgctgagag	ccagcctgtg	tatacccgca	ctgcctcctt	ccaaggccag	1200
cccttcactt	ggtgcctgct	gcacaacttt	gggggaaatc	atggcttttt	tggagccttg	1260
gaggccgtga	acggagggcc	agaagctgcc	cgctctctcc	ccaactccac	aatggtaggc	1320
acgggcctgg	ccccgagggg	catcagccag	aacgaagtgg	tctattccct	catggctgag	1380
ctgggctggc	gaaaggaccc	agtgccagat	ttggcagcct	gggtgaccag	ctttgccgcc	1440
cggcggtatg	gggtctccca	cccggacgca	ggggcagcgt	ggaggctact	gctccggagt	1500
gtgtacaact	gctccgggga	ggcatgcagg	ggccacaatc	gtagcccgct	ggtcaggcgg	1560
ccgtccctac	agatgaatac	cagcatctgg	tacaaccgat	ctgatgtgtt	tgaggcctgg	1620
cggctgctgc	tcacatctgc	tccctccctg	gccaccagcc	ccgccttccg	ctacgacctg	1680
ctggacctca	ctcggcaggc	agtgcaggag	ctggtcagct	tgtattatga	ggaggcaaga	1740
agcgctatc	tgagcaaggga	gctggcctcc	ttgttagagg	ctggaggcgt	cctggcctat	1800
gagctgctgc	cggcactgga	cagagtgctg	gctagtgaca	gccgcttctt	gctgggcagc	1860
tggctagagc	aggcccagag	agcggcagtc	agtgaggccg	aggccgattt	ctacgagcag	1920
aacagccgct	accagctgac	cttgtggggg	ccagaaggca	acatcctgga	ctatgccaac	1980
aagcagctgg	cgggggttgg	ggccaactac	tacaccctc	gctggcggct	tttcttgag	2040
gcgctggttg	acagtggtgg	ccagggcatc	cctttccaac	agcaccagtt	tgacaaaaat	2100
gtcttccaac	tggagcaggc	cttcgttctc	agcaagcaga	ggtacccag	ccagcccgga	2160
ggagacactg	tggacctggc	caagaagatc	ttcctcaaat	attacccccc	ctgggtggcc	2220
ggctcttgg	gatt					2234

(서열 번호 2)

### 도면3

#### 1.1kb OV 프로모터

gttaagtcct cagacttggc aaggagaatg tagatttcca cagtatatat gttttcacia	60
aaggaaggag agaaacaaaa gaaaatggca ctgactaaac ttcagctagt ggtataggaa	120
agtaattctg cttacacagag attgcagtga tctctatgta tgcctgaag aattatgttg	180
tacttttttc cccattttt aaatcaaaca gtgctttaca gaggtcagaa tggtttcttt	240
actgtttgtc aattctatta tttcaatata gaacaatagc ttctataact gaaatatatt	300
tgtatttgta tattatgatt gtccctcgaa ccatgaacac tctccagct gaatttcaca	360
attcctctgt catctgccag gccattaagt tattcatgga agatctttga ggaacactgc	420
aagttcatat cataaacaca tttgaaattg agtattgttt tgcattgtat ggagctatgt	480
tttgctgtat cctcagaata aaagtgtgtt ataaagcatt cacaccata aaaagataga	540
tttaaatatt ccaactatag gaaagaaagt gtgtctgtc ttcactctag tctcagttgg	600
ctccttcaca tgcacgcttc tttattttct ctattttgtc aagaaaataa taggtcaagt	660
cttgttctca tttatgtcct gtctagcgtg gctcagatgc acattgtaca tacaagaagg	720
atcaaatgaa acagacttct ggtctgttac tacaaccata gtaataagca cactaactaa	780
taattgctaa ttatgttttc catctccaag gtccccacat ttttctgttt tcttaaagat	840
cccattatct ggttgtaact gaagctcaat ggaacatgag caatatttcc cagtcttctc	900
tcccatccaa cagtcctgat ggattagcag aacaggcaga aaacacattg ttaccagaa	960
ttaaaaacta atatttgctc tccattcaat ccaaaatgga cctattgaaa ctaaaatcta	1020
acccaatccc attaaatgat ttctatggtg tcaaaggcca aacttctgaa gggaacctgt	1080
gggtgggtca caattcagac tatatattcc ccagggtcca gccagtgtct gt	1132

(서열 번호 3)

도면4a

pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu

ggccgcaaga agaaagctga aaaactctgt cccttccaac aagaccacaga gcactgtagt	60
atcaggggta aaatgaaaag tatgttatct gctgcatcca gacttcataa aagctggagc	120
ttaattcaga aaaaaaatca gaaagaaatt acactgtgag aacagggtgca attcactttt	180
cctttacaca gagtaatact ggtaactcat ggatgaaggo ttaagggaat gaaattggac	240
tcacagtact gagtcatcac actgaaaaat gcaacctgat acatcagcag aagggttatg	300
ggggaaaaat gcagccttcc aattaagcca gatatctgta tgaccaagct gctccagaat	360
tagtcactca aaatctctca gattaaatta tcaactgtca ccaaccattc ctatgctgac	420
aaggcaattg cttgttctct gtgttcctga tactacaagg ctcttcctga ctctctaaag	480
atgcattata aaaatcttat aattcacatt tctccctaaa ctttgactca atcatggtat	540
ggtggcaaat atggtatat attattcaaa ttgttttctt tgtaccata tgtaatgggt	600
cttgtgaatg tgctcttttg ttcttttaat cataataaaa acatgtttta gcaaacactt	660
ttcacttgta gtatttgaag gtaccggatc tcgagccgcc ttcaatgcc ccaaaaccaa	720
tccccagggt ttttaactct ccgattttcc aagtaccata gcccgctgag agagcgccgc	780
ggtaatggga tcccaggacc ccgggggaata taagtctgag ggggacgtaa gcaacccttc	840
cttttgtaac agggacaaca tagcccttat ttcttcttta gaaggagagg ttttccgca	900
ataggtctta cacgcggagc aaatcacctt tatgacggct tccatgcttg atccaccggg	960
cgaccggaat cacgcagagc aaccggaatc acgcctgggg tggaccgctc agtcgtcggg	1020
cttctctccc gtcttccaac gactctctga gttctcggtt ggggatgttg gccccctgca	1080
gtagggctcc ctccgagccc actcagcttc tgccctccta agccgcagcc cctctacta	1140
gggtcatcgt ccgctccccg aataagcgag acggatgagg acaggatcgc cacgcgcct	1200
gtggccgacc actattccct aacgatcacg tcggggtcac caaatgaagc ctctgcttc	1260
atgcattgtc tcgtagtctg cagggaatca acggtccggc catcaaccca ggtgcacacc	1320
aatgtggtga atggtcaaat ggcgtttatt gtatcgagct aggcacttaa atacaatatc	1380
tctgcaatgc ggaattcagt ggttcgtcca atcgtgtta gaccgctctg ttgccttctt	1440
aacaaggcac gatcatacca cgatcatacc accttactcc caccaatcgg catgcacggt	1500
gctttttctc tccctataag gcatgttgct aactcatcgt tacataagca tgttgcaaga	1560
ctacaagagt attgcataag actacatttc cccctcccta tgcaaaagcg aaactactat	1620
atcctgaggg gactcctaac cgcgtacaac cgaagcccg cttttcgctt aaacatgcta	1680
ttgtcccctc agtcaagcct tgcccgttac aacccgattc gcaagccttg cctccccac	1740
attatccgta gcattatttc ctacgagtc ttagagctac agaagatact ctatgctgta	1800
gccaaagtca caagtttact attcagcgac ctcttatatt ccgctgcca gccgatcaat	1860
taccaatgcg cgcttgggct aatcatggct atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	1920
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaaagcct ggggtgccta	1980
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa	2040
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgctgat	2100
tgggcgctct tccgcttctt cgtcactga ctgcctgcgc tcggctgctt ggtgogggc	2160



도면4b

agcgggtatca	gctcactcaa	aggcggtaat	acgggtatcc	acagaaatcag	gggataaacgc	2220
aggaaagaac	atgtgagcaa	aaggccagca	aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	2280
gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgctcaag	2340
tcagaggtgg	cgaaccgga	caggactata	aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	2400
cctcgtgccc	tctcctgttc	cgaccctgcc	gcttaccgga	tacctgtccg	cctttctccc	2460
ttcgggaagc	gtggcgcttt	ctcatagctc	acgctgtagg	tatctcagtt	cgggtgtagg	2520
cgttcgcctc	aagctgggct	gtgtgcacga	acccccggt	cagcccgacc	gctgcgcctt	2580
atccggtaac	tatcgtcttg	agtccaaccc	ggtaagacac	gacttatcgc	cactggcagc	2640
agccactgg	aacaggatta	gcagagcgag	gtatgtaggc	ggtgctacag	agttcttgaa	2700
gtggtggcct	aactacggct	acactagaag	gacagtattt	ggtatctgcg	ctctgctgaa	2760
gccagttacc	ttcggaaaaa	gagttggtag	ctcttgatcc	ggcaaaaaaa	ccaccgctgg	2820
tagcgggtgg	ttttttgttt	gcaagcagca	gattacgcgc	agaaaaaaag	gatctcaaga	2880
agatcctttg	atcttttcta	cggggtctga	cgctcagtgg	aacgaaaaact	cacgttaagg	2940
gattttggtc	atgagattat	caaaaaaggat	cttcacctag	atccttttaa	attaaaaatg	3000
aagttttaaa	tcaatctaaa	gtatatatga	gtaaacttgg	tctgacagtt	accaatgctt	3060
aatcagtgg	gcacctatct	cagcgatctg	tctatttctg	tcattccatag	ttgcctgact	3120
ccccgctcgt	tagataacta	cgatacggga	gggcttaacca	tctggcccca	gtgctgcaat	3180
gataccgcga	gacccacgct	caccggctcc	agatttatca	gcaataaaacc	agccagccgg	3240
aaggggccga	cgcagaagtg	gtcctgcaac	tttatccgoc	tcattccagt	ctattaattg	3300
ttgcccggaa	gctagagtaa	gtagttcgcc	agttaatagt	ttgcgcgaacg	ttgttgccat	3360
tgctacaggc	atcgtgggtg	cacgctcgtc	gtttggtag	gcttcattca	gctccggttc	3420
ccaacgatca	aggcgagtta	catgatcccc	catgttgtgc	aaaaaagcgg	ttagctcctt	3480
cggctcctcc	atcgtttgca	gaagtaagtt	ggccgcagtg	ttatcactca	tggttatggc	3540
agcactgcat	aattctctta	ctgtcatgcc	atccgtaaga	tgctttttctg	tgactggtga	3600
gtactcaacc	aagtcattct	gagaatagtg	tatgcggcga	cagagttgct	cttgcccggc	3660
gtcaatacgg	gataataccg	cgccacatag	cagaacttta	aaagtgtctca	tcattggaaa	3720
acgttctctg	gggcgaaaaa	tctcaaggat	cttaccgctg	ttgagatcca	gttcgatgta	3780
acccactcgt	gcacccaact	gatcttcagc	atcttttact	ttcaccagcg	tttctgggtg	3840
agcaaaaaa	ggaaggcaaa	atgccgcaaa	aaagggaata	agggcgacac	ggaaatgttg	3900
aatactcata	ctcttctctt	ttcaatatta	ttgaagcatt	tatcagggtt	attgtctcat	3960
gagcggatac	atatttgaat	gtatttagaa	aaataaaaca	ataggggttc	cgcgcacatt	4020
tccccgaaaa	gtgccacctg	acgcgccttg	tagcggcgca	ttaagcgcgg	cgggtgtggt	4080
ggttacgcgc	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcctta	gcgcgcgctc	ctttcgcttt	4140
cttcccttcc	tttctcgcca	cgttcgccgg	ctttcccgct	caagctctaa	atcgggggct	4200
ccctttagg	ttccgattta	gtgctttacg	gcacctcgac	cccaaaaaac	ttgattagg	4260
tgatggttca	cgtagtgggc	catcgccctg	atagacgggt	tttcgccttt	tgacgttgga	4320
gtccacgttc	tttaatatgt	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	4380
ggtctattct	tttgatttat	aagggtattt	gccgatttct	gcctatttgt	taaaaaatga	4440
gctgatttaa	caaaaattta	acgcgaattt	taacaaaata	ttaacgctta	caatttccat	4500
tcgccattca	ggctgcgcaa	ctgttgagg	ggcgatcgg	tgccggcctc	ttcgctatta	4560
cgccagctgg	cgaaggggg	atgtgctgca	aggcgattaa	gttgggtaac	gccagggttt	4620
tcccagtcac	gacgttgtaa	aacgacggcc	agtgcgcgcg	tattccctaa	cgatcacgct	4680
ggggtcacca	aatgaagcct	tctgcttcac	gcattgtgct	gtagtcgtca	gggaatcaac	4740
ggtccggcca	tcaacccagg	tgcaacccaa	tgtggtgaat	ggtcaaatgg	cgtttattgt	4800
atcgagctag	gcacttaaat	acaatatctc	tgcaatgcgg	aattcagtgg	ttcgtccaat	4860
ccgtccccct	ccctatgcaa	aagcgaaact	actatatcct	gaggggactc	ctaaccgctg	4920
acaaccgaag	ccccgctttt	cgcctaaaca	tgcatttgtc	ccctcagtc	agccttgccc	4980
gttacaaccc	gattcgcaag	ccttgccctc	cccacattat	ccgtagcatt	atttctagc	5040
agtcatcaga	gctacagaag	atactctatg	ctgtagccaa	gtctacaagt	ttactattca	5100

도면4c

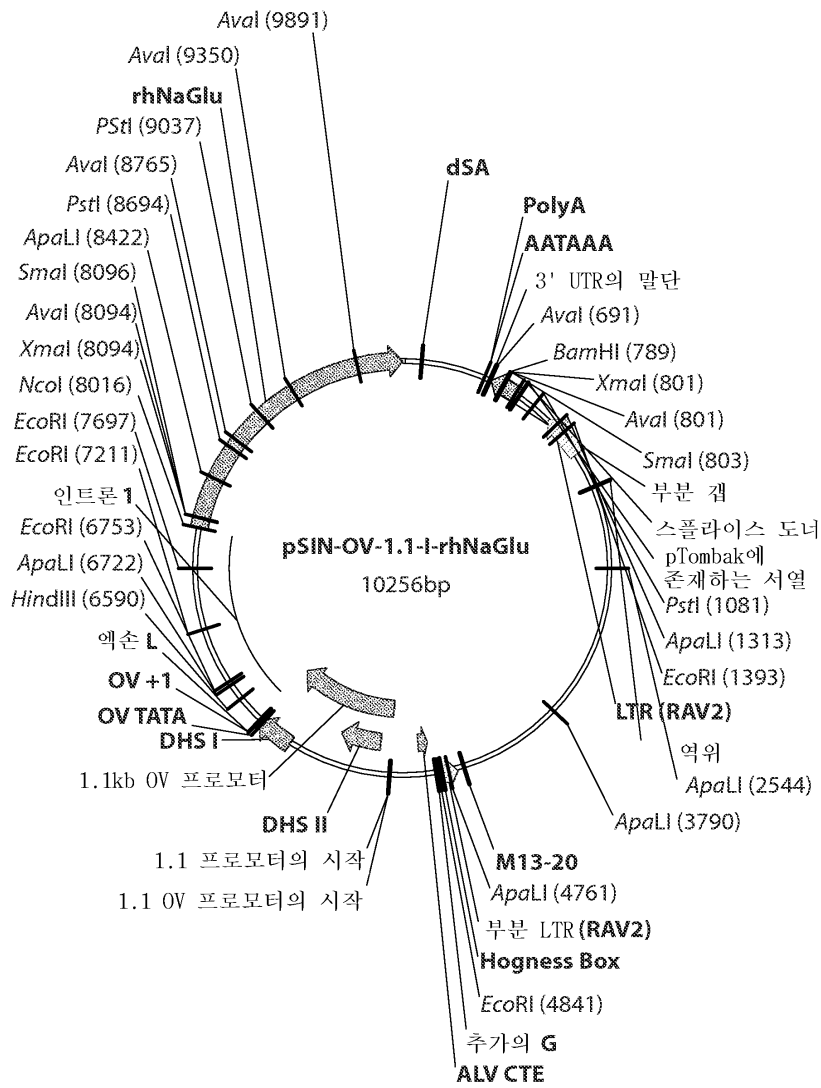
gogacctcct	atattccgcg	tgccagccga	tcaattacca	atccaaccag	ctatcacacg	5160
gaatacaaga	actogcctac	gctcttcttt	cgggctgctt	ataagcctcc	tgtaattttt	5220
ttatatctct	cgttaagtcc	tcagacttgg	caaggagaat	gtagatttcc	acagtatata	5280
tgttttcaca	aaaggaagga	gagaaacaaa	agaaaatggc	actgactaaa	cttcagctag	5340
tggtatagga	aagtaattct	gcttaacaga	gattgcagtg	atctctatgt	atgtcctgaa	5400
gaattatgtt	gtactttttt	ccccattttt	taaatcaaac	agtgtcttac	agaggtcaga	5460
atgggtttctt	tactgtttgt	caattctatt	atttcaatac	agaacaatag	cttctataac	5520
tgaaatatat	ttgtctattgt	atattatgat	tgctcctcga	accatgaaca	ctcctccagc	5580
tgaatttcac	aattcctctg	tcactctgca	ggccatttaag	ttattcatgg	aagatctttg	5640
aggaacactg	caagtccata	tcataaacac	atttgaaatt	gagtattgtt	ttgcattgta	5700
tgagagctatg	ttttgctgta	tcctcagaat	aaaagtgtgt	tataaagcat	tcacacccat	5760
aaaaagatag	attttaaata	tccaactata	ggaaagaaag	tggtgtctgt	cttcaactta	5820
gtctcagttg	gctcctttac	atgcacgctt	ctttatttct	cctattttgt	caagaaaata	5880
atagggtcaag	tctgtttctc	atztatgtcc	tgctctagct	ggctcagatg	cacattgtac	5940
atacaagaag	gatcaaatga	aacagacttc	tggtctgtta	ctacaacccat	agtaataagc	6000
acactaaacta	ataattgcta	attatgtttt	ccatctccaa	gggtcccaca	tttttctgtt	6060
ttcttaaaga	tcccattatc	tggttgtaac	tgaagctcaa	tggaacatga	gcaatatttc	6120
ccagtcctct	ctcccatcca	acagtcctga	tggtattgca	gaacaggcag	aaaacacatt	6180
gttaccocaga	attaaaaact	aattattgct	ctccattcaa	tccaaaatgg	acctattgaa	6240
actaaaatct	aacccaatcc	cattaaatga	tttctatggt	gtcaaaggtc	aaacttctga	6300
agggaaacctg	tggtgtgggtc	acaattcaga	ctatatattc	cccagggtct	agccagtgtc	6360
tgtacataca	gctagaaaagc	tgtattgcct	ttagcagtc	agctcgaaag	gtaagcaact	6420
ctctggaatt	acctctctct	tatatagct	cttacttgca	cctaaacttt	aaaaaattaa	6480
caatttatgt	gotatgtgtt	gtatctttaa	gggtgaagta	cctgcgtgat	acccctata	6540
aaaaacttct	acctgtgtat	gcattctgca	ctattttatt	atgtgtaaaa	gctttgtgtt	6600
tgttttcagg	aggcttattc	tttgtgtcta	aaatatgttt	ttaatttcag	aacatcttat	6660
cctgtcgttc	actatctgat	atgctttgca	gtttgtctga	ttaacttcta	gccctacaga	6720
gtgcacagag	agcaaaatca	tggtgttcag	tgaattctgg	ggagtatttt	taatgtgaaa	6780
attctctaga	agtttaattc	ctgcaaagtg	cagctgctga	tcactacaca	agataaaaaat	6840
gtgggggggtg	cataaacgta	tattcttaca	ataatagata	catgtgaact	tatatacaga	6900
aaagaaaatg	agaaaaatgt	gtgtgtgtat	actcacacac	gtggtcagta	aaaacttttg	6960
aggggtttta	tacagaaaat	ccaatcctga	ggccccagca	ctcagtagc	atataaagg	7020
ctgggctctg	aaggacttct	gactttcaca	gattatataa	atctcaggaa	agcaactaga	7080
ttcatgctgg	ctccaaaagc	tgtgctttat	ataagcacac	tggtatata	atagttgtac	7140
agttcagctc	tttataatag	aaacagacag	aacaagtata	aatcttctat	tggtctatgt	7200
catgaacaag	aattcattca	gtggctctgt	tttatagtaa	acattgctat	tttatcatgt	7260
ctgcatttct	cttctgtctg	aatgtcacca	ctaaaaat	actccacaga	aagttttatac	7320
tacagtacac	atgcatact	ttgagcaaag	caaaccatac	ctgaaagtgc	aatagagcag	7380
aatatgaatt	acatgcgtgt	ctttctccta	gactacatga	cccatataa	attacattcc	7440
ttatctatcc	tgccatcacc	aaaacaaagg	taaaaaact	tttgaagatc	tactcatagc	7500
aagtagtgtg	caacaaacag	atatttctct	acatttattt	ttaggggaata	aaaataagaa	7560
ataaaaatag	cagcaagcct	ctgctttctc	atatactgt	ccaaacctaa	agttttactga	7620
aatttgctct	ttgaatttcc	agttttgcaa	gocctatcaga	ttgtgtttta	atcagaggta	7680
ctgaaaagta	tcaatgaatt	ctagctttca	ctgaacaaaa	atatgtagag	gcaactggct	7740
tctgggacag	tttgctaccc	aaaagacaac	tgaatgcaaa	tacataaata	gatttatgaa	7800
tatgggttttg	aacatgcaca	tgagaggtgg	atatagcaac	agacacatta	ccacagaatt	7860
actttaaaac	tacttgttaa	catttaattg	cctaaaaact	gctcgtaatt	tactgttgta	7920
gocctaccata	gagtaccctg	catggtaacta	tgtacagcat	tccatcctta	cattttcact	7980

도면4d

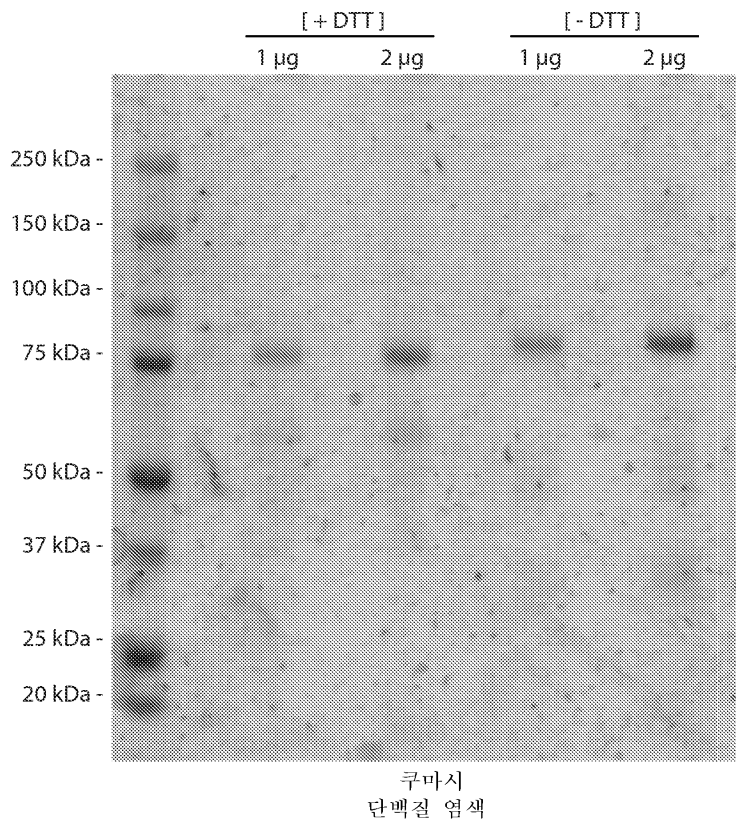
gttctgctgt	ttgctctaga	caactcagag	ttcaccatgg	agggcggtggc	ggtggccgcg	8040
gcgggtggggg	tccttctcct	ggccggggcc	gggggcgcgg	caggcgacga	ggcccgagg	8100
gcggcgcccg	tgccggcgct	cgtggcccgg	ctgctggggc	caggccccgc	ggccgacttc	8160
tccgtgtcgg	tggagcgcg	tctggctgcc	aagccgggct	tggacaccta	cagcctgggc	8220
ggcgggcgcg	cggcgcgct	gcgggtgcgc	ggctccacgg	gcgtggcagc	cgcgcgggg	8280
ctgcaccgct	acctgcgcga	cttctgtggc	tgccacgtgg	cctggtccgg	ctctcagctg	8340
cgcctgccgc	ggccactgcc	agccgtgccg	ggggagctga	ccgaggccac	gcccacagg	8400
taccgctatt	accagaatgt	gtgcacgcaa	agctactctt	tcgtgtggtg	ggactggggc	8460
cgggtgggagc	gagagataga	ctggatggcg	ctgaatggca	tcaacctggc	actggcatgg	8520
agcgccagg	aggccatctg	gcagcggtg	tacctggcct	tgggcctgac	ccaggcagag	8580
atcaatgagt	tctttactgg	tcctgccttc	ttggcatggg	ggcgaatggg	caacctgcac	8640
acctgggatg	gccccctgcc	cccctcctgg	cacatcaagc	agctttatct	gcagcaccgg	8700
gtcctggacc	agatgcgctc	cttcggcatg	accccagtcg	tgctgcatt	cgcggggcat	8760
gttcccgagg	ctgtcaccag	gggtgtccct	caggccaatg	tcaogaagat	gggcagttgg	8820
ggccacttta	actgttccta	ctcctgctcc	ttccttctgg	ctcgggaaga	ccccatattc	8880
cccacatcog	ggagcctctt	cttcggagag	ctgatcaaag	agtttggcac	agaccacatc	8940
tatggggccg	acactttcaa	tgagatgcag	ccaccttctc	cagagccctc	ctatcttgcc	9000
gcagccacca	ctgccgtcta	tgaggccatg	actgcagtg	atactgaggc	tgtgtggctg	9060
ctccaaggct	ggctcttcca	gcaccagcog	cagttcttggg	ggcccgcca	gatcagggtc	9120
gtgtggggag	ctgtgccccg	tggcgcgcctc	ctggttctgg	acctgtttgc	tgagagccag	9180
cctgtgtata	ccgcactgc	ctccttccaa	ggccagccct	tcatctggtg	catgctgcac	9240
aactttgggg	gaaatcatgg	tctttttgga	gccttgagg	ccgtgaacgg	aggccagaa	9300
gctgccccgc	tcttccccaa	ctccacaatg	gtaggcacgg	gcatggcccc	caggggcac	9360
agccagaaog	aagtgggtcta	ttccctcatg	gctgagctgg	gctggcgaaa	ggaccagtg	9420
ccagatttg	cagcctgggt	gaccagcttt	gcccgcgggc	ggtatgggg	ctcccacccg	9480
gacgcagggg	cagcgtggag	gctactgctc	cggagtgtgt	acaactgctc	cggggaggca	9540
tgacggggcc	acaatcgtag	cccgtctggc	aggcgccgt	ccctacagat	gaataccagc	9600
atctggtaca	accgatctga	tgtgtttgag	gcctggcggc	tgctgctcac	atctgctccc	9660
tccttgcca	ccagccccgc	cttcgcgtac	gacctgctgg	acctcactcg	gcaggcagtg	9720
caggagctgg	tcagcttgta	ttatgaggag	gcaagaagcg	cctatctgag	caaggagctg	9780
gcctccttgt	tgagggtgg	aggcgtcctg	gcctatgagc	tgctgccggc	actggacgag	9840
gtgtgggcta	gtgacagccg	cttcttggctg	ggcagctggc	tagagcaggc	ccgagcagcg	9900
gcagtcagtg	aggccgaggc	cgatttctac	gagcagaaca	gccgctacca	gctgaccttg	9960
tggggggccag	aaggcaacat	cctggactat	gccaacaagc	agctggcggg	gttgggtggc	10020
aactactaca	cccctcgtg	gcgcttttc	ctggaggcgc	tggttgacag	tgtggcccag	10080
ggcatccctt	tccaacagca	ccagtttgac	aaaaatgtct	tccaactgga	gcaggccttc	10140
gttctcagca	agcagaggta	ccccagccag	cgcgaggag	acactgtgga	cctggccaag	10200
aagatcttcc	tcaaatatta	cccccgctgg	gtggccggct	cttgggtgatt	cgaagc	10256

(서열 번호 4)

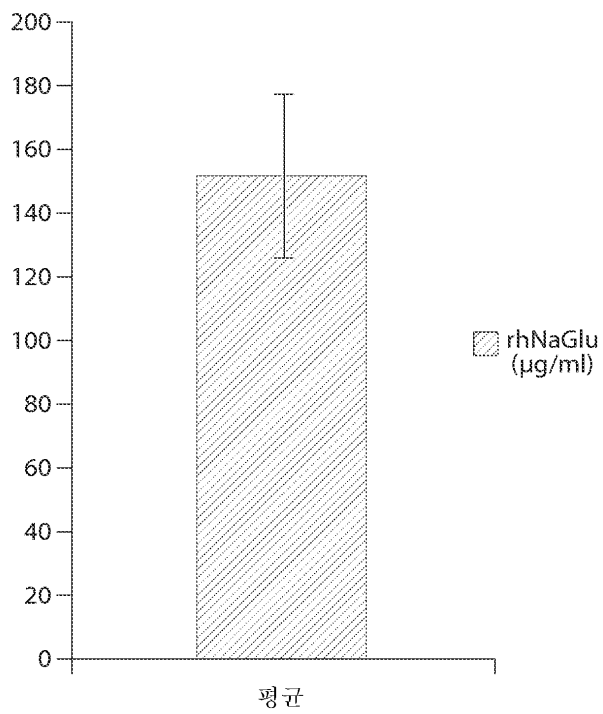
도면5



도면6

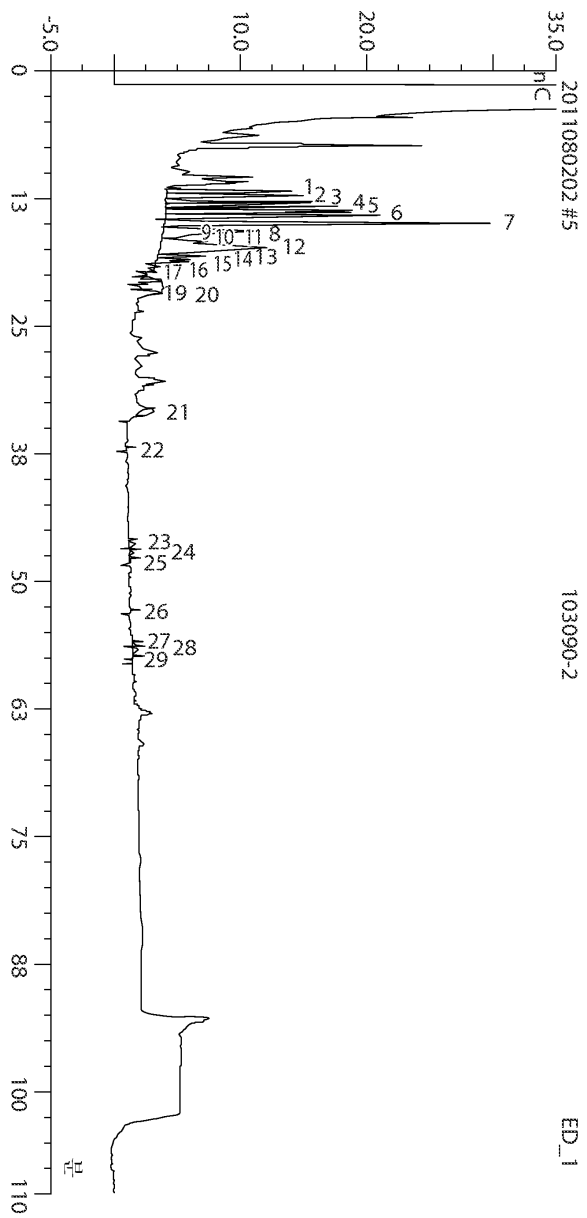


도면7

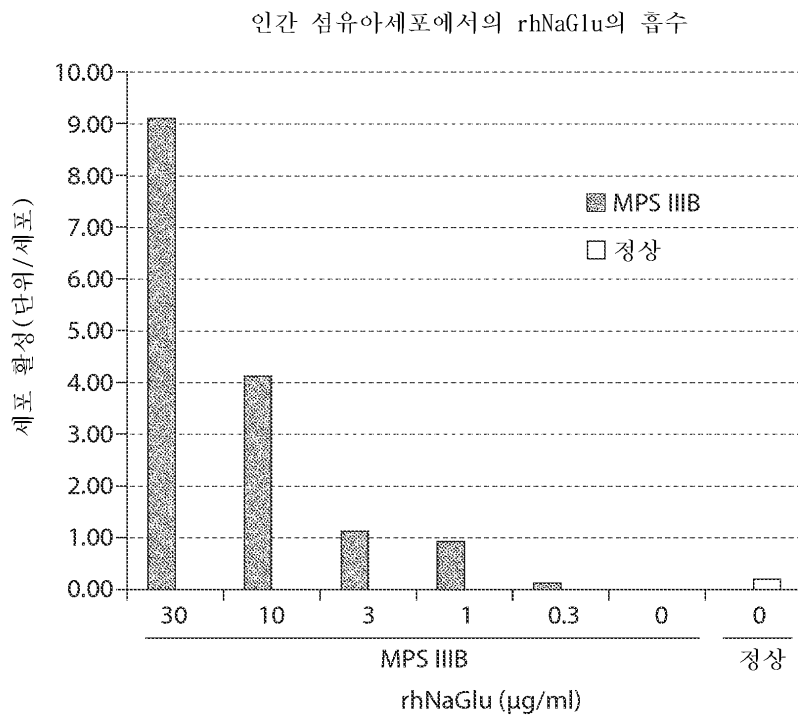




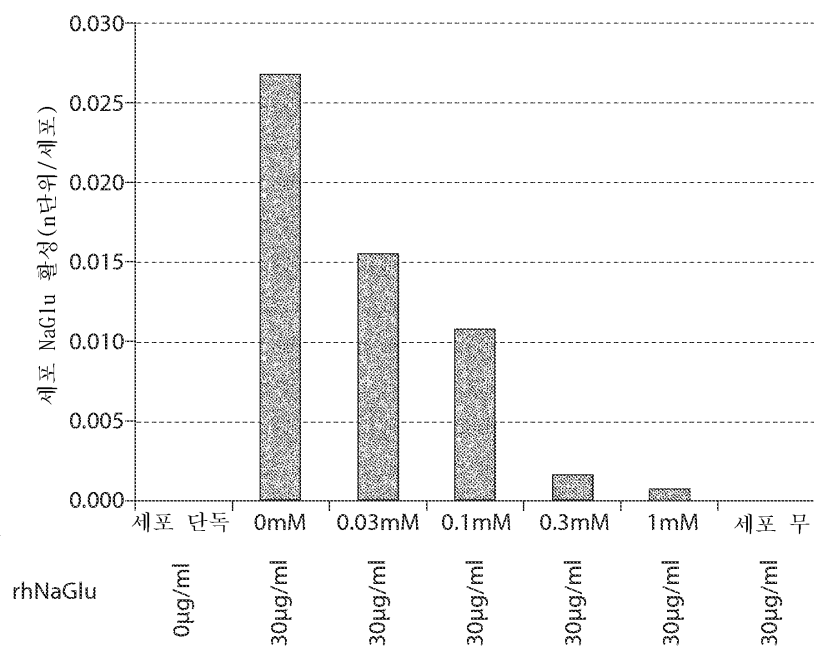
도면8



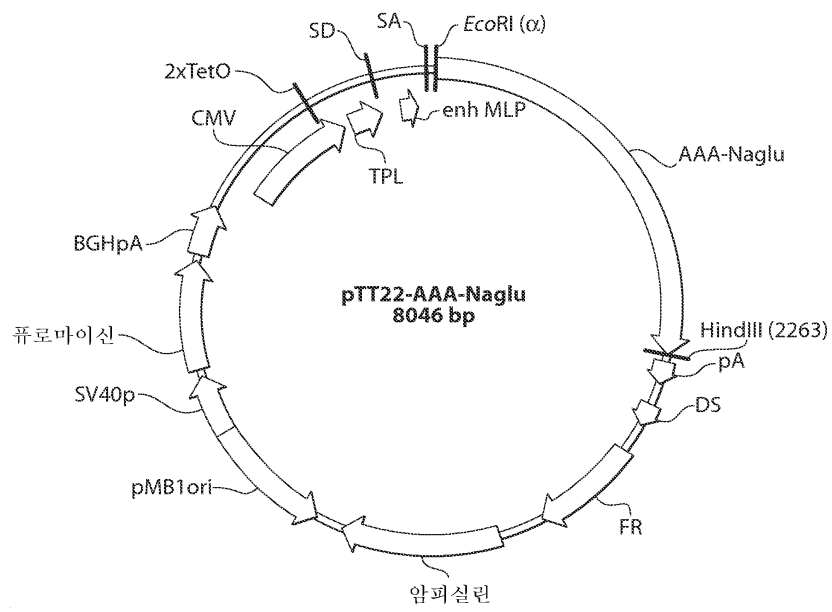
도면9



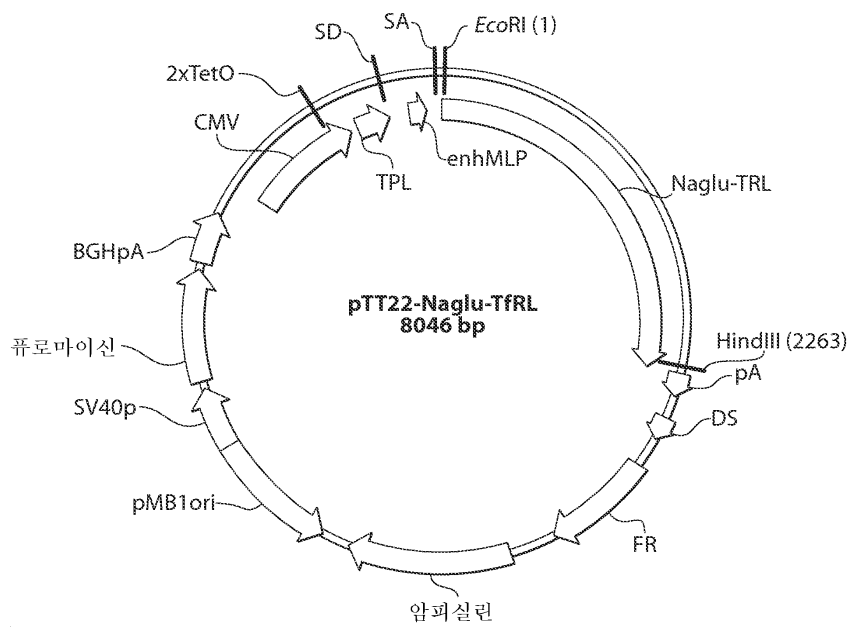
도면10



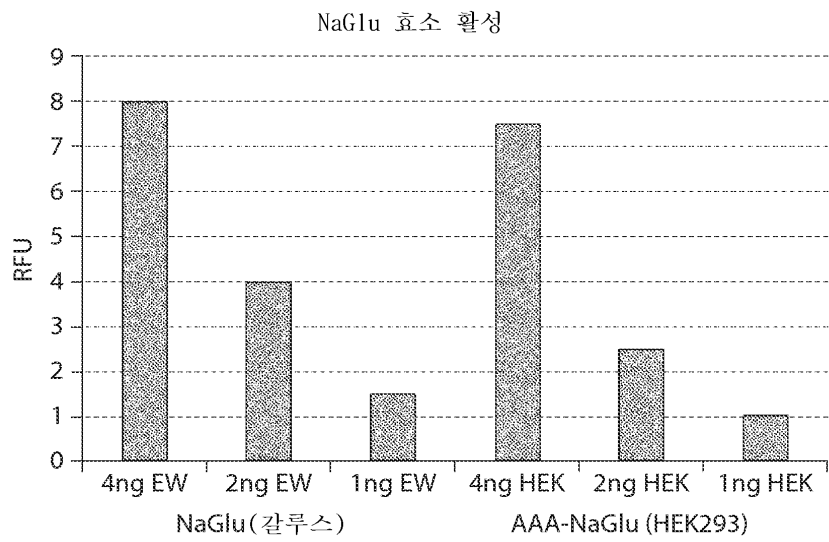
도면11



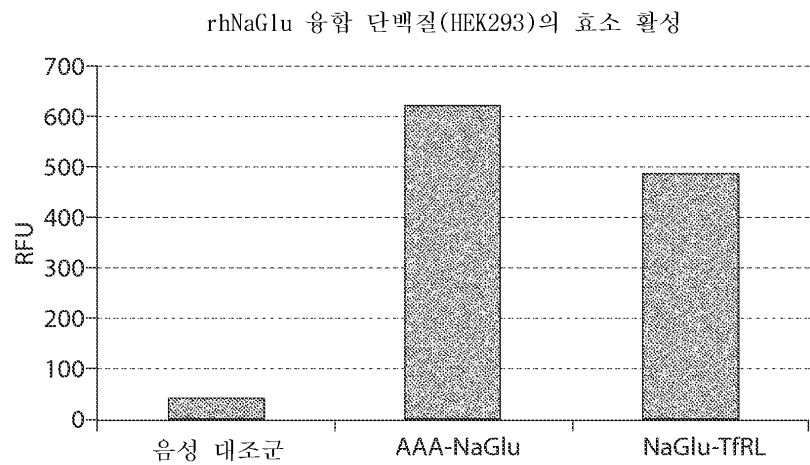
도면12



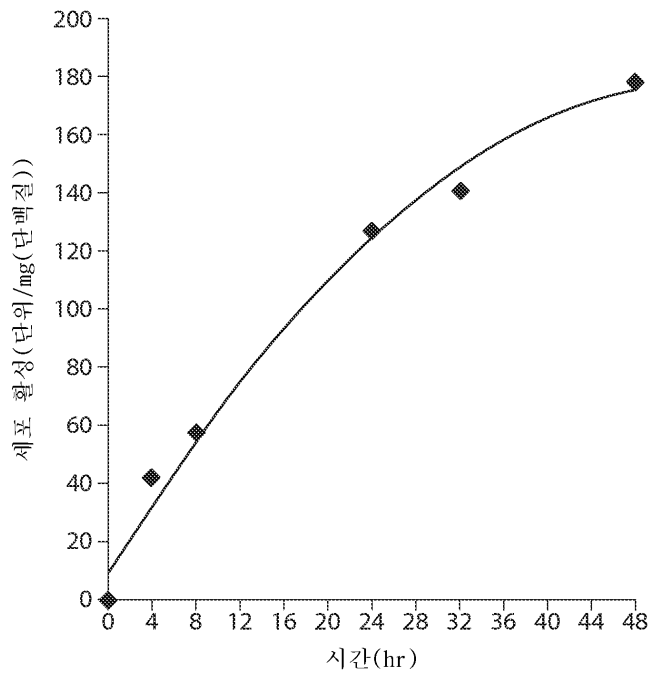
도면13



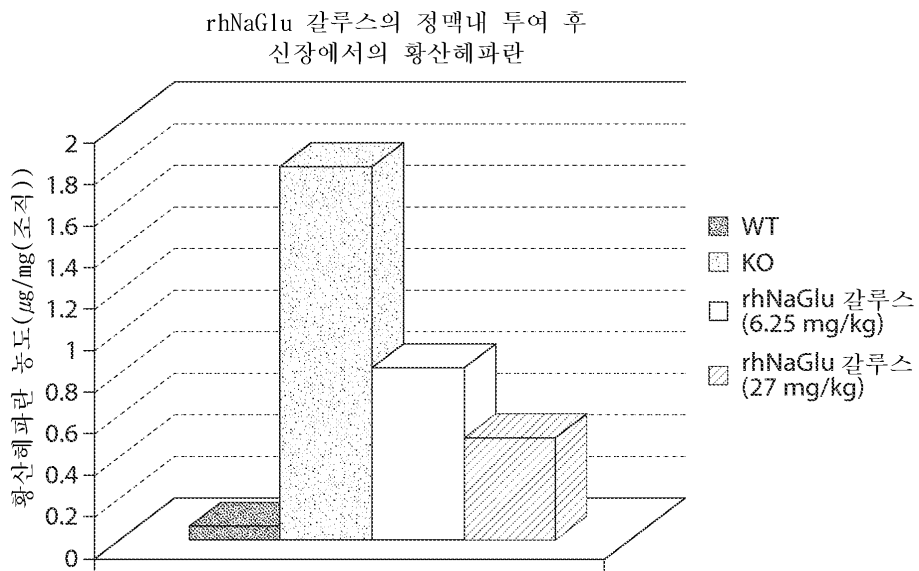
도면14



도면15

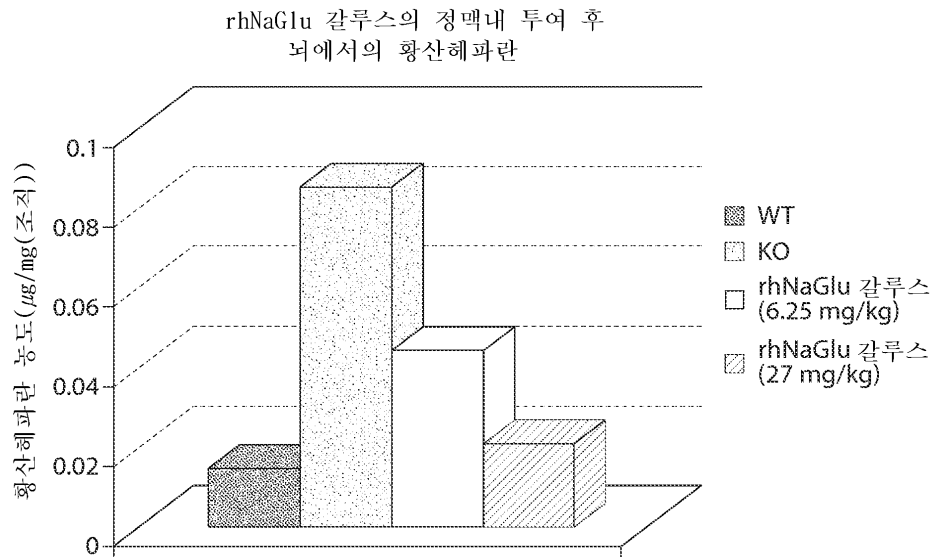


도면16

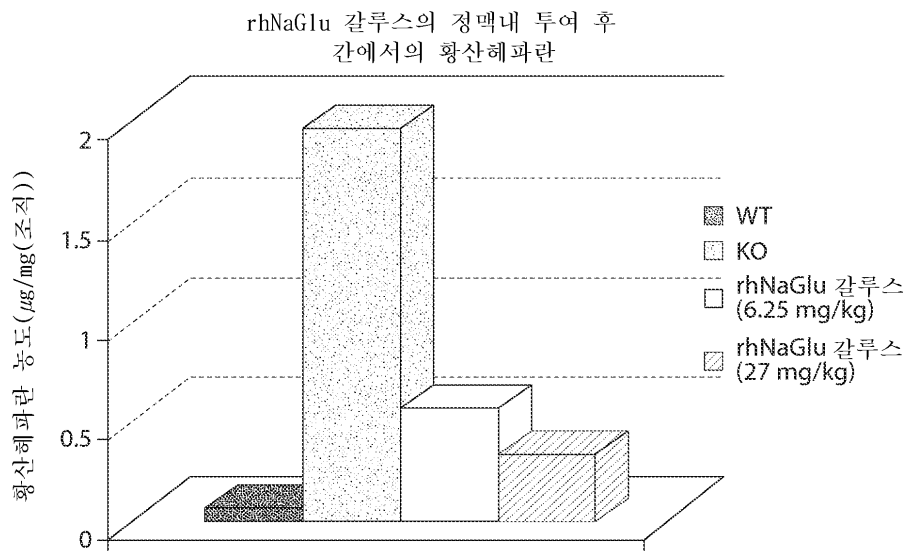




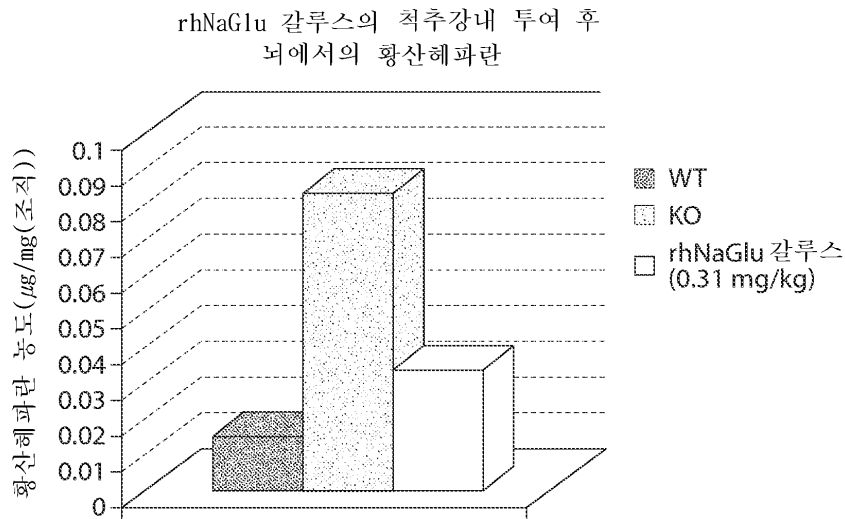
도면17



도면18



도면19



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SYNAGEVA BIOPHARMA CORP.

<120> RECOMBINANT HUMAN NAGLU PROTEIN AND USES THEREOF

<130> WO2013/055888

<140> PCT/US2012/059708

<141> 2012-10-11

<150> US 61/546,248

<151> 2011-10-12

<160> 5

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 743

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Glu Ala Val Ala Val Ala Ala Ala Val Gly Val Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Ala Ala Gly Asp Glu Ala Arg Glu Ala Ala Ala Val

20 25 30

Arg Ala Leu Val Ala Arg Leu Leu Gly Pro Gly Pro Ala Ala Asp Phe  
 35 40 45  
 Ser Val Ser Val Glu Arg Ala Leu Ala Ala Lys Pro Gly Leu Asp Thr  
 50 55 60  
 Tyr Ser Leu Gly Gly Gly Gly Ala Ala Arg Val Arg Val Arg Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Gly Val Ala Ala Ala Ala Gly Leu His Arg Tyr Leu Arg Asp Phe  
 85 90 95  
 Cys Gly Cys His Val Ala Trp Ser Gly Ser Gln Leu Arg Leu Pro Arg  
 100 105 110  
 Pro Leu Pro Ala Val Pro Gly Glu Leu Thr Glu Ala Thr Pro Asn Arg  
 115 120 125  
 Tyr Arg Tyr Tyr Gln Asn Val Cys Thr Gln Ser Tyr Ser Phe Val Trp  
 130 135 140  
 Trp Asp Trp Ala Arg Trp Glu Arg Glu Ile Asp Trp Met Ala Leu Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Asn Leu Ala Leu Ala Trp Ser Gly Gln Glu Ala Ile Trp Gln  
 165 170 175  
 Arg Val Tyr Leu Ala Leu Gly Leu Thr Gln Ala Glu Ile Asn Glu Phe  
 180 185 190  
 Phe Thr Gly Pro Ala Phe Leu Ala Trp Gly Arg Met Gly Asn Leu His  
 195 200 205  
 Thr Trp Asp Gly Pro Leu Pro Pro Ser Trp His Ile Lys Gln Leu Tyr  
 210 215 220  
 Leu Gln His Arg Val Leu Asp Gln Met Arg Ser Phe Gly Met Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Val Leu Pro Ala Phe Ala Gly His Val Pro Glu Ala Val Thr Arg Val  
 245 250 255  
 Phe Pro Gln Val Asn Val Thr Lys Met Gly Ser Trp Gly His Phe Asn  
 260 265 270  
 Cys Ser Tyr Ser Cys Ser Phe Leu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Ile Phe

275                      280                      285  
 Pro Ile Ile Gly Ser Leu Phe Leu Arg Glu Leu Ile Lys Glu Phe Gly  
 290                      295                      300  
 Thr Asp His Ile Tyr Gly Ala Asp Thr Phe Asn Glu Met Gln Pro Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Ser Ser Glu Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ala Thr Thr Ala Val Tyr Glu  
 325                      330                      335  
 Ala Met Thr Ala Val Asp Thr Glu Ala Val Trp Leu Leu Gln Gly Trp  
  
 340                      345                      350  
 Leu Phe Gln His Gln Pro Gln Phe Trp Gly Pro Ala Gln Ile Arg Ala  
 355                      360                      365  
 Val Leu Gly Ala Val Pro Arg Gly Arg Leu Leu Val Leu Asp Leu Phe  
 370                      375                      380  
 Ala Glu Ser Gln Pro Val Tyr Thr Arg Thr Ala Ser Phe Gln Gly Gln  
 385                      390                      395                      400  
 Pro Phe Ile Trp Cys Met Leu His Asn Phe Gly Gly Asn His Gly Leu  
  
 405                      410                      415  
 Phe Gly Ala Leu Glu Ala Val Asn Gly Gly Pro Glu Ala Ala Arg Leu  
 420                      425                      430  
 Phe Pro Asn Ser Thr Met Val Gly Thr Gly Met Ala Pro Glu Gly Ile  
 435                      440                      445  
 Ser Gln Asn Glu Val Val Tyr Ser Leu Met Ala Glu Leu Gly Trp Arg  
 450                      455                      460  
 Lys Asp Pro Val Pro Asp Leu Ala Ala Trp Val Thr Ser Phe Ala Ala  
  
 465                      470                      475                      480  
 Arg Arg Tyr Gly Val Ser His Pro Asp Ala Gly Ala Ala Trp Arg Leu  
 485                      490                      495  
 Leu Leu Arg Ser Val Tyr Asn Cys Ser Gly Glu Ala Cys Arg Gly His  
 500                      505                      510  
 Asn Arg Ser Pro Leu Val Arg Arg Pro Ser Leu Gln Met Asn Thr Ser  
 515                      520                      525

Ile Trp Tyr Asn Arg Ser Asp Val Phe Glu Ala Trp Arg Leu Leu Leu

530 535 540

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

545 550 555 560

Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Val Gln Glu Leu Val Ser Leu Tyr Tyr

565 570 575

Glu Glu Ala Arg Ser Ala Tyr Leu Ser Lys Glu Leu Ala Ser Leu Leu

580 585 590

Arg Ala Gly Gly Val Leu Ala Tyr Glu Leu Leu Pro Ala Leu Asp Glu

595 600 605

Val Leu Ala Ser Asp Ser Arg Phe Leu Leu Gly Ser Trp Leu Glu Gln

610 615 620

Ala Arg Ala Ala Ala Val Ser Glu Ala Glu Ala Asp Phe Tyr Glu Gln

625 630 635 640

Asn Ser Arg Tyr Gln Leu Thr Leu Trp Gly Pro Glu Gly Asn Ile Leu

645 650 655

Asp Tyr Ala Asn Lys Gln Leu Ala Gly Leu Val Ala Asn Tyr Tyr Thr

660 665 670

Pro Arg Trp Arg Leu Phe Leu Glu Ala Leu Val Asp Ser Val Ala Gln

675 680 685

Gly Ile Pro Phe Gln Gln His Gln Phe Asp Lys Asn Val Phe Gln Leu

690 695 700

Glu Gln Ala Phe Val Leu Ser Lys Gln Arg Tyr Pro Ser Gln Pro Arg

705 710 715 720

Gly Asp Thr Val Asp Leu Ala Lys Lys Ile Phe Leu Lys Tyr Tyr Pro

725 730 735

Arg Trp Val Ala Gly Ser Trp

740

<210> 2

<211> 2234

<212> DNA



<213> Human

<400> 2

atggaggcgg tggcgggtggc cgcggcgggtg ggggtccttc tcttgcccgg ggccgggggc	60
gcggcaggcg acgaggcccg ggaggcggcg gccgtgcggg cgctcgtggc cggcgtgctg	120
gggccaggcc ccgcggccga cttctccgtg tcggtggagc gcgctcgtggc tgccaagccg	180
ggcttggaca cctacagcct gggcggcggc ggcgcggcgc gcgtgcgggt gcgcggctcc	240
acgggcgtgg cagccgcgcg ggggctgcac cgctacctgc gcgacttctg tggctgccac	300
gtggcctggt ccggctctca gctgcgcctg ccgcggccac tgccagccgt gccgggggag	360
ctgaccgagg ccacgcccac caggtaccgc tattaccaga atgtgtgcac gcaaagctac	420
tctttcgtgt ggtgggactg gggccgggtg gagcgagaga tagactggat ggcgctgaat	480
ggcatcaacc tggcactggc atggagcggc caggaggcca tctggcagcg ggtgtacctg	540
gccttgggcc tgaccaggc agagatcaat gatttcttta ctggtcctgc cttcttggca	600
tggggcgcaa tgggcaacct gcacacctgg gatggcccc tgccccctc ctggcacatc	660
aagcagcttt atctgcagca ccgggtcctg gaccagatgc gtccttcgg catgaccca	720
gtgctgcctg cattcgcggg gcatgttccc gaggtgtca ccagggtgtt cctcaggtc	780
aatgtcacga agatgggcag ttggggccac tttaactgtt cctactcctg ctccttcctt	840
ctggctccgg aagaccccat attcccac atcgggagcc tcttcttgcg agagctgac	900
aaagagttag gcacagacca catctatggg gccgacactt tcaatgagat gcagccacct	960
tcctcagagc cctcctatct tgccgcagcc accactgccg tctatgagc catgactgca	1020
gtggatactg aggtgtgtg gctgtccaa ggctggctct tccagcacca gccgcagtgc	1080
tgggggcccc ccagatcag ggctgtgtg ggagctgtgc cccgtggccg cctcctggtt	1140
ctggacctgt ttgtgagag ccagcctgtg tatacccgca ctgcctcctt ccaagccag	1200
cccttcactt ggtgcatgct gcacaacttt gggggaaatc atggtctttt tggagccttg	1260
gaggccgtga acggaggccc agaagctgcc cgcctcttcc ccaactccac aatggtagc	1320
acgggcatgg cccccagggt catcagccag aacgaagtgg tctatccct catggctgag	1380
ctgggctggc gaaaggaccc agtgccagat ttggcagcct gggtgaccag ctttgccgc	1440
cggcggtatg ggttctccca cccggacgca ggggcagcgt ggaggctact gtcgcggagt	1500
gtgtacaact gtcgccccga ggcatgcagg ggccacaatc gtagcccgct ggtcaggcgg	1560
ccgtccctac agatgaatac cagcatctgg tacaaccgat ctgatgtgtt tgaggcctgg	1620
cggctgtgc tcacatctgc tcctccctg gccaccagcc ccgcttccg ctacgacctg	1680
ctggacctca ctcggcaggc agtgcaggag ctggtcagct tgtattatga ggaggcaaga	1740

agcgcctatc tgagcaagga gctggcctcc ttgttgaggg ctggaggcgt cctggcctat 1800  
gagctgctgc cggcactgga cgaggtgctg gctagtgaca gccgcttctt gctgggcagc 1860  
tggttagagc aggccccgagc agcggcagtc agtgaggccg aggccgattt ctacgagcag 1920  
aacagccgct accagctgac cttgtggggg ccagaaggca acatcctgga ctatgccaac 1980

aagcagctgg cggggttggg ggccaactac tacacccctc gctggcggct tttcctggag 2040  
gcgctggttg acagtgtggc ccagggcac cctttccaac agcaccagtt tgacaaaaat 2100  
gtcttccaac tggagcaggc cttcgttttc agcaagcaga ggtacccag ccagccgca 2160  
ggagacactg tggacctggc caagaagatc ttcctcaaat attaccccg ctgggtggcc 2220  
ggctcttggg gatt 2234

<210> 3  
<211> 1132  
<212> DNA  
<213> Chicken  
<400> 3

gttaagtcct cagacttggc aaggagaatg tagatttcca cagtatatat gttttcaca 60

aaggaaggag agaaacaaaa gaaaatggca ctgactaaac ttcagctagt ggtataggaa 120  
agtaattctg cttaacagag attgcagtga tctctatgta tgtcctgaag aattatgttg 180  
tacttttttc cccattttt aaatcaaaca gtgctttaca gaggtcagaa tggttttctt 240  
actgtttgtc aattctatta tttcaataca gaacaatagc tttataact gaaatatatt 300  
tgctattgta tattatgatt gtcctcgaa ccatgaacac tctccagct gaatttcaca 360  
attcctctgt catctgccag gccattaagt tattcatgga agatctttga ggaacactgc 420  
aagttcatat cataaacaca ttgaaattg agtattgttt tgcattgtat ggagctatgt 480

tttgctgtat ctcagaata aaagtttgtt ataaagcatt cacaccata aaaagataga 540  
tttaaatatt ccaactatag gaaagaaagt gtgtctgctc ttcactctag tctcagttgg 600  
ctccttcaca tgcacgttc tttatttttc ctattttgtc aagaaaataa taggtcaagt 660  
cttgttttca tttatgtcct gtctagcgtg gctcagatgc acattgtaca tacaagaagg 720  
atcaaatgaa acagacttct ggtctgttac tacaaccata gtaataagca cactaactaa 780  
taattgctaa ttatgttttc catctccaag gttcccat ttttctgttt tcttaaagat 840  
cccattatct ggttgtaact gaagctcaat ggaacatgag caatatttcc cagtcttctc 900

tccatccaa cagtctgat ggattagcag aacaggcaga aaacacattg ttaccagaa 960  
ttaaaaacta atatttgctc tccattcaat ccaaaatgga cctattgaaa ctaaaatcta 1020

acccaatccc attaaatgat ttctatgggtg tcaaagggtca aacttctgaa gggaacctgt 1080  
 gggtgggtca caattcagac tataatattcc ccagggtca gccagtgtct gt 1132  
 <210> 4  
 <211> 10256  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> pSIN-OV-1.1-I-rhNaGlu  
 <400> 4  
 ggccgcaaga agaaagctga aaaactctgt cccttccaac aagaccaga gcactgtagt 60  
 atcaggggta aaatgaaaag tatgttatct gctgcatcca gacttcataa aagctggagc 120  
 ttaattcaga aaaaaaatca gaaagaaatt aactgtgag aacaggtgca attcactttt 180  
 cctttacaca gagtaatact ggtaactcat ggatgaaggc ttaagggaat gaaattggac 240  
 tcacagtact gagtcacac actgaaaaat gcaacctgat acatcagcag aaggtttatg 300  
 ggggaaaaat gcagccttcc aattaagcca gatatctgta tgaccaagct gctccagaat 360  
 tagtcactca aaatctctca gattaaatta tcaactgtca ccaaccattc ctatgctgac 420  
 aaggcaattg ctgtttctct gtgttctga tactacaagg ctcttctga cttcctaaag 480  
 atgcattata aaaatcttat aattcacatt tctccctaaa ctttgactca atcatggtat 540  
 gttggcaaat atggtatatt actattcaaa ttgttttct tgtaccata tgtaatgggt 600  
 cttgtgaatg tgctcttttg ttcttttaat cataataaaa acatgtttta gcaaactt 660  
 ttcaattgta gtatttgaag gtaccggatc tcgagccgcc ttcaatgccc caaaaacaa 720  
 tccccagggt ttaactctc ccgattttcc aagtaccata gcccgtgag agagccgc 780  
 ggtaatggga tcccaggacc ccggggaata taagtctgag ggggacgtaa gcaaccctt 840  
 cttttgtaac agggaaca tagccctat ttcttttta gaaggagagg ttttccgca 900  
 ataggctta cagcggacg aaatcacctt tatgacggct tccatgcttg atccaccggg 960  
 cgaccggaat cagcagagc aaccggaatc acgcctgggg tggaccgctc agtcgtcggg 1020  
 ctctctccc gtcttccaac gactctctga gttctcggtg gggtatgttg gccccctgca 1080  
 gtagggctcc ctccgacgc actcagcttc tgccctccta agccgagcc cccttacta 1140  
 gggtcatcgt ccgtccccg aataagcgag acggatgagg acaggatcgc cagccgcct 1200  
 gtggccgacc actattccct aacgatcacg tgggggtcac caaatgaagc cttctgcttc 1260  
 atgcatgtgc tcgtagtcgt cagggaatca acggtccggc catcaacca ggtgcacacc 1320  
 aatgtggtga atggtcaaat ggcgtttatt gtatcgagct aggcacttaa atacaatatc 1380

tctgcaatgc ggaattcagt ggttcgtcca atccgtgtta gaccgctctg ttgccttcct	1440
aacaaggcac gatcatacca cgatcatacc accttactcc caccaatcgg catgcacggt	1500
gctttttctc tccttataag gcatgttgct aactcatcgt tacataagca tgttgcaaga	1560
ctacaagagt attgcataag actacatttc cccctcccta tgcaaaagcg aaactactat	1620
atcctgaggg gactcctaac cgcgtacaac cgaagccccg cttttcgctt aaacatgcta	1680
ttgtcccttc agtcaagcct tgcccgttac aacccgattc gcaagccttg ccttccccac	1740
attatccgta gcattatttc ctagcagtca tcagagctac agaagatact ctatgctgta	1800
gccaaagtcta caagtttact attcagcgac ctcttatatt ccgctgtcca gccgatcaat	1860
taccaatgcg cgcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	1920
gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaacctt ggggtgccta	1980
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa	2040
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	2100
tgggcgtctt tccgcttcct cgctcactga ctgcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg	2160
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	2220
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt	2280
gctggcgctt ttccatagcg tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	2340
tcagaggtag cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	2400
cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc	2460
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt	2520
cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt	2580
atccgtaac tatcgtcttg agtccaacct ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	2640
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	2700
gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatct ggtatctgcg ctctgctgaa	2760
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggttag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg	2820
tagcggtagt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga	2880
agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg	2940
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg	3000
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt	3060
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcattccatag ttgcctgact	3120
ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat	3180
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg	3240

aagggccgag cgagaaagt gtcctgcaac ttatccgcc tccatccagt ctattaattg	3300
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat	3360
tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc	3420
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt	3480
cggtcctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc	3540
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga	3600
gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct ctgcccggc	3660
gtcaatacgg gataataccg gcgccatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa	3720
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgaigta	3780
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg	3840
agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg	3900
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat	3960
gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca atagggttc cgcgcacatt	4020
tccccgaaaa gtgccacctg acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtggt	4080
ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgctc ctttcgcttt	4140
cttccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct	4200
ccctttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac ttgattaggg	4260
tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt tgacgttgga	4320
gtccacgttc tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaacactca accctatctc	4380
ggtctattct ttgatattat aagggtttt gccgatttcg gcctattggt taaaaatga	4440
gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgtta caatttccat	4500
tcgccattca ggtcgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta	4560
cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt	4620
tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgagcgcg tattccctaa cgatcacgtc	4680
ggggtcacca aatgaagcct tctgttcat gcatgtgctc gtagtcgtca gggaatcaac	4740
ggtccggcca tcaaccagg tgcacaccaa tgggtgaat ggtcaaatgg cgtttattgt	4800
atcgagctag gcaattaaat acaatatctc tgcaatgcgg aattcagtgg ttcgtccaat	4860
ccgtccccct ccctatgcaa aagcgaaact actatatcct gaggggactc ctaaccgcgt	4920
acaaccgaag ccccgctttt cgcctaaaca tgctattgtc ccctcagtca agccttgccc	4980
gttacaaccc gattcgcaag ccttgccctc cccacattat ccgtagcatt atttctagc	5040
agtcatcaga gctacagaag atactctatg ctgtagccaa gtctacaagt ttactattca	5100



gcgacctcct atattccgcg tgccagccga tcaattacca atccaaccag ctatcacacg 5160

gaatacaaga actcgcctac gctcttcttt cgggctgctt ataagcctcc tgtaattttt 5220

ttatatctct cgtaagtcc tcagacttgg caaggagaat gtagatttcc acagtatata 5280

tgttttcaca aaaggaagga gagaacaaa agaaaatggc actgactaaa cttcagctag 5340

tggatatagga aagtaattct gcttaacaga gattgcagtg atctctatgt atgtcctgaa 5400

gaattatgtt gtactttttt cccccatttt taaatcaaac agtgccttac agaggtcaga 5460

atggtttctt tactgtttgt caattctatt atttcaatac agaacaatag cttctataac 5520

tgaaatataat ttgctattgt atattatgat tgtccctcga accatgaaca ctctccagc 5580

tgaatttcac aattccctcg tcatctgcca ggccatttga ttattcatgg aagatctttg 5640

aggaacactg caagttcata tcataaacac atttgaattt gagtattgtt ttgcattgta 5700

tggagctatg ttttgcgtga tcctcagaat aaaagtttgt tataaagcat tcacacccat 5760

aaaaagatag atttaaatat tccaactata ggaaagaaag tgtgtctgct cttcactcta 5820

gtctcagttg gctccttcac atgcacgctt ctttatttct cctattttgt caagaaaata 5880

ataggtaag tcttgttctc atttatgtcc tgtctagcgt ggctcagatg cacattgtac 5940

atacaagaag gatcaaatga aacagacttc tggctctgta ctacaacat agtaataagc 6000

acactaacta ataattgcta attatgtttt ccatctccaa ggttcccaca tttttctgtt 6060

ttcttaaaga tccatttacc tggttgtaac tgaagctcaa tggaacatga gcaatatttc 6120

ccagtcttct ctcccatcca acagtcctga tggattagca gaacaggcag aaaacacatt 6180

gttaccaga attaaaaact aatatttgc tccattcaa tccaaaatgg acctattgaa 6240

actaaaatct aacccaatcc cattaaatga ttctatgggt gtcaaaggct aaacttctga 6300

agggaacctg tgggtgggtc acaattcaga ctatatattc cccagggtc agccagtgtc 6360

tgtacataca gctagaaagc tgtattgcct ttagcagtca agctcgaaag gtaagcaact 6420

ctctggaatt accttctctc tatattagct ctacttgca cctaaacttt aaaaaattaa 6480

caattattgt gctatgtgtt gtatctttta gggatgaagta cctgcgtgat acccctata 6540

aaaacttctc acctgtgtat gcattctgca ctattttatt atgtgtaaaa gctttgtgtt 6600

tgttttcagg aggtttattc tttgtgctta aaatatgttt ttaatttcag aacatcttat 6660

cctgtcgttc actatctgat atgctttgca gtttgcttga ttaacttcta gccctacaga 6720

gtgcacagag agcaaaatca tgggtttcag tgaattctgg ggagtatttt taatgtgaaa 6780

attctctaga agtttaattc ctgcaaagtg cagctgctga tcactacaca agataaaaat 6840

gtggggggtg cataaacgta tattcttaca ataatagata catgtgaact tatatacaga	6900
aaagaaaatg agaaaaatgt gtgtgtgtat actcacacac gtggtcagta aaaacttttg	6960
aggggtttaa tacagaaaat ccaatcctga ggccccagca ctccagtacgc atataaaggg	7020
ctgggctctg aaggacttct gactttcaca gattatataa atctcaggaa agcaactaga	7080
ttcatgctgg ctccaaaagc tgtgctttat ataagcacac tggctataca atagtgtac	7140
agttcagctc ttataaatag aaacagacag aacaagtata aatcttctat tggctcatgt	7200
catgaacaag aattcattca gtggctctgt ttatagtaa acattgctat ttatcatgt	7260
ctgcatttct cttctgtctg aatgtcacca ctaaaattta actccacaga aagtttatac	7320
tacagtacac atgcatactt ttgagcaaag caaacctaac ctgaaagtgc aatagagcag	7380
aatatgaatt acatgcgtgt ctttctccta gactacatga ccccatataa attacattcc	7440
ttatctattc tgccatcacc aaaacaaagg taaaaaact tttgaagatc tactcatagc	7500
aagtagtgtg caacaaacag atatttctct acatttatit ttagggaata aaaataagaa	7560
ataaaatagt cagcaagcct ctgctttctc atatatctgt ccaaacctaa agtttactga	7620
aatttgcctt ttgaatttcc agttttgcaa gcctatcaga ttgtgtttta atcagaggta	7680
ctgaaaagta tcaatgaatt ctagctttca ctgaacaaaa atatgtagag gcaactggct	7740
tctgggacag ttgtctaccc aaaagacaac tgaatgcaaa tacataaata gatttatgaa	7800
tatggttttg aacatgcaca tgagagggtgg atatagcaac agacacatta ccacagaatt	7860
actttaaaac tacttgttaa catttaattg cctaaaaact gctcgttaatt tactgttgta	7920
gcctaccata gagtaccctg catggtacta tgtacagcat tccatcctta cattttcact	7980
gttctgctgt ttgtcttaga caactcagag ttaccatgg aggcgggtggc ggtggccgcg	8040
gcggtggggg tcctttctct gcccgggggc gggggcgcgg caggcgacga ggccccggag	8100
gcggcggcgc tgcgggcgct cgtggccccg ctgctggggc caggccccgc ggccgacttc	8160
tccgtgtcgg tggagcgcgc tctggctgcc aagccgggct tggacaccta cagcctgggc	8220
ggcggcggcg cggcgcgcgt gcgggtgcgc ggctccacgg gcgtggcagc cgccgcgggg	8280
ctgcaccgct acctgcgcga cttctgtggc tgccacgtgg cctggtccgg ctctcagctg	8340
cgcttccgc gccactgcc agccgtgccg ggggagctga ccgaggccac gcccaacagg	8400
taccgtatt accagaatgt gtgcacgcaa agctactctt tcgtgtggtg ggactgggcc	8460
cgggtgggagc gagagataga ctggatggcg ctgaatggca tcaacctggc actggcatgg	8520
agcggccagg aggccatctg gcagcgggtg tacctggcct tgggcctgac ccaggcagag	8580
atcaatgagt tctttactgg tctgccttc ttggcatggg ggcgaaatgg caacctgcac	8640
acctgggatg gccccctgcc cccctcctgg cacatcaagc agctttatct gcagaccgg	8700

gtcctggacc agatgcgctc cttcgcatg acccagtcg tgcctgcatt cgcggggcat 8760  
gttcccagg ctgtcaccag ggtgttcct caggtaatg tcacgaagat gggcagttgg 8820  
ggccacttta actgttccta ctctgtctc ttcttcttgg ctccgaaga ccccatattc 8880  
cccatcatcg ggagcctctt cttgcgagag ctgatcaaag agtttggcac agaccacatc 8940

tatggggccg acactttcaa tgagatgcag ccaccttct cagagccctc ctatcttgcc 9000  
gcagccacca ctgccgtcta tgaggccatg actgcagtgg ataactgaggc tgtgtggctg 9060  
ctccaaggct ggctcttcca gcaccagccg cagtcttggg gggccgcca gatcagggt 9120  
gtgctgggag ctgtgccccg tggccgctc ctggttctgg acctgtttgc tgagagccag 9180  
cctgtgtata cccgactgc ctcttccaa ggccagccct tcacttggtg catgtgcac 9240  
aactttgggg gaaatcatgg tctttttgga gccttgagg cgtgaacgg agggccagaa 9300  
gtgccccgc tcttcccaa ctccacaatg gtaggcacgg gcatggcccc cgagggcac 9360

agccagaacg aagtggctca ttccctcatg gctgagctgg gctggcgaaa ggacccagt 9420  
ccagatttgg cagcctgggt gaccagcttt gccgcccggc ggtatgggt ctcccaccg 9480  
gacgcagggg cagcgtggag gctactgtc cggagtgtg acaactgtc cggggaggca 9540  
tgaggggcc acaatcgtg cccgtggtc aggcggcgt ccctacagat gaataccagc 9600  
atctgttaca accgatctga tgtgtttgag gcctggcggc tgctgtcac atctgtccc 9660  
tccctggcca ccagccccg cttccgtac gacctgtgg acctactcg gcaggcagt 9720  
caggagctgg tcagcttgta ttataggag gcaagaagcg cctatctgag caaggagctg 9780

gcctccttgt tgagggtgg aggcgtctg gcctatgagc tgctgccgc actggacgag 9840  
gtgtggcta gtgacagccg cttcttctg ggcagctggc tagagcaggc ccgagcagcg 9900  
gcagtcatg aggccgagc gatttctac gagcagaaca gccgtacca gctgacctg 9960  
tgggggccag aaggcaacat cctggactat gccaacaagc agctggcggg gttggtggc 10020  
aactactaca cccctcgtg gcggctttc ctggaggcgc tggttgacag tgtggcccag 10080  
ggcatccct tccaacagca ccagtttgac aaaaatgtct tccaactgga gcaggcctc 10140  
gttctcagca agcagaggta cccagccag ccgagaggag aactgtgga cctggccaag 10200

aagatcttc tcaaatatta ccccgtgg gtggccggct cttggtgatt cgaagc 10256

<210> 5  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Transferrin receptor ligand (TfRL)

<400> 5

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro

1 5 10