



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0106990  
(43) 공개일자 2019년09월18일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>A61K 35/51</i> (2015.01) <i>A61K 31/155</i> (2006.01)<br/> <i>A61K 31/436</i> (2006.01) <i>A61K 31/5377</i> (2006.01)<br/> <i>A61K 31/7076</i> (2006.01) <i>A61K 38/47</i> (2006.01)<br/> <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61P 25/02</i> (2006.01)<br/> <i>C12N 15/86</i> (2006.01) <i>C12N 9/24</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>A61K 35/51</i> (2013.01)<br/> <i>A61K 31/155</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7012608<br/>                 (22) 출원일자(국제) 2018년01월19일<br/>                 심사청구일자 없음<br/>                 (85) 번역문제출일자 2019년04월30일<br/>                 (86) 국제출원번호 PCT/US2018/014370<br/>                 (87) 국제공개번호 WO 2018/136710<br/>                 국제공개일자 2018년07월26일<br/>                 (30) 우선권주장<br/>                 62/448,433 2017년01월20일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 유니버시티 오브 피츠버그-오브 더 커먼웰스 시스템 오브 하이어 에듀케이션<br/>                 미국 15260 펜실베이니아 피츠버그 새커리 애비뉴 130 가드너 스틸 컨퍼런스 센터 1층</p> <p>(72) 발명자<br/>                 에스콜라 마리아 루이사<br/>                 미국 15224 펜실베이니아주 피츠버그 펜 애비뉴 4401 플라자 빌딩 4층<br/>                 사블치 폴<br/>                 미국 15224 펜실베이니아주 피츠버그 펜 애비뉴 4401 스위트 9비</p> <p>(74) 대리인<br/>                 김진희, 김태홍</p> |
|--|---|

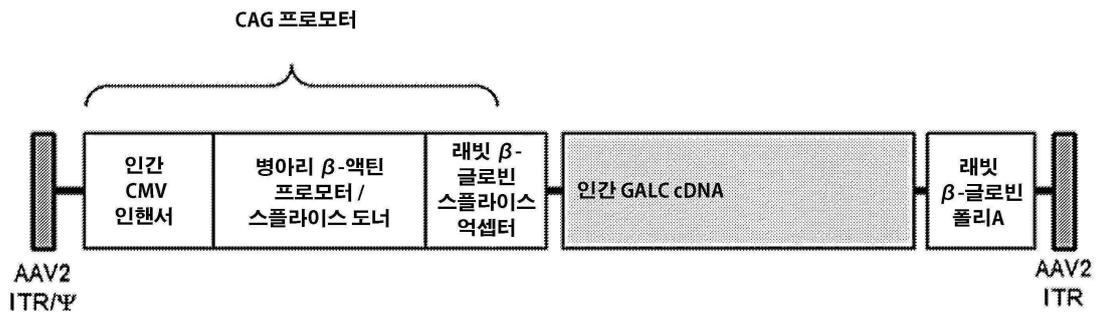
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **제대혈 이식(UCBT) 및 증가된 갈락토세레브로시다아제(GALC) 발현을 이용한 크라베병의 치료**

**(57) 요약**

본 출원은 크라베병, 예를 들어 유아에서의 크라베병의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상체에서, 예를 들어 골수세포 레지먼의 수행에 의해 대상체를 면역억제하는 단계, 제대혈 이식(UCBT)(예컨대, 동종이계 UCBT)을 수행하는 단계, 및 갈락토세레브로시다아제(GALC)의 발현을 증가시키는 단계(예를 들어, 유전자 편집을 이용하여)를 포함할 수 있다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

*A61K 31/436* (2013.01)

*A61K 31/5377* (2013.01)

*A61K 31/7076* (2013.01)

*A61K 38/47* (2013.01)

*A61K 48/005* (2013.01)

*A61P 25/02* (2018.01)

*C12N 15/86* (2013.01)

*C12N 9/2402* (2013.01)

*C12Y 302/01046* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

대상체에서 크라베병을 치료하는 방법으로서,  
 대상체를 면역억제하는 단계;  
 대상체에게 치료 유효량의 제대혈을 투여하는 단계; 및  
 대상체에게 치료 유효량의, 갈락토세레브로시다아제(GALC)를 코딩하는 핵산 분자를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 크라베병을 치료하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 1에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 핵산 분자는 서열번호 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 포함하는 GALC 단백질을 코딩하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 백터의 일부분인 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 백터는 바이러스 백터인 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 바이러스 백터는 아데노 연관 백터(AAV)인 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 아데노 연관 백터는 AAV 혈청형 rh.10인 방법.

#### 청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 백터는 적어도  $2 \times 10^{13}$  gc/대상체 또는 적어도  $2 \times 10^{14}$  gc/대상체의 용량으로 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제대혈은 GALC를 코딩하는 핵산 분자 이전에 투여되는 것인 방법.

#### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제대혈은 GALC를 코딩하는 핵산 분자 1일 전에 투여되는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제대혈은 대상체에 대해 동종이계인 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 제대혈을 투여하는 단계는, 대상체에게 적어도  $3 \times 10^7$ /kg의 총 유핵 세포 용량을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체를 면역억제하는 단계는, 치료 유효량의 알렘투주맙, 히드록시우레아, 플루다라빈, 및 부셀판을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체를 면역억제하는 단계는, 치료 유효량의 타크롤리무스 및 미코페놀레이트 모페틸(MMF)을 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 크라베병은 유아형(infantile) 크라베병인 방법.

**청구항 18**

대상체에서 유전병을 치료하는 방법으로서,

대상체에서 골수를 일부 또는 전부 제거하는 단계;

대상체에게 치료 유효량의 조혈모세포(HSC)를 투여하는 단계; 및

대상체에게 치료 유효량의 치료적 핵산 분자를 투여하는 단계로서, 상기 핵산 분자는 유전병을 교정하는 것인 단계

를 포함하는, 대상체에서 유전병을 치료하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 골수를 일부 또는 전부 제거하는 단계는, 대상체에게 치료량의 화학요법, 방사선, 또는 둘 다를 실시하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 20**

제18항 또는 제19항에 있어서, HSC의 투여 이후, 대상체에게 치료 유효량의 면역억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 1월 20일 출원된 미국 가출원 제62/448,433호를 우선권 주장의 기초로 하며, 상기 미국 가출원은 그 전체가 본 출원에 참고로 인용된다.

[0003] 분야

[0004] 본 출원은 환자를 면역억제하고, 제대혈 이식(UCBT)을 제공하고, 및 환자에서 갈락토세레브로시다아제(GALC)의 발현을 증가시킴으로써(예를 들어, GALC를 발현하는 바이러스 벡터를 이용함으로써) 크라베병을 치료하는 방법

을 제공한다. 또한, 다른 유전병을 치료하기 위한 유사한 방법이 제공된다.

**배경 기술**

[0005] 크라베병은, 신경계의 정상적인 미엘린화의 발달 및 유지에 필수적인 효소인 갈락토세레브로시다아제(GALC)의 결핍 또는 부재에 의해 야기되는 희귀 유전 용해소체축적 질환이다. 초기 유아형(infantile) 크라베병으로 공지된, 가장 심한 형태의 크라베병 을 앓고 있는 영아들은 생후 6개월까지 증상이 나타나고, 빠른 점진적인 신경 퇴행을 경험하고, 전형적으로 생후 2년까지 사망에 이른다. 또한, 심각한 장애와 조기 사망은, 후기 유아기 및 소년기 발병을 포함하는 후기 발병 형태의 크라베병 환자에서도 발생할 수 있다.

[0006] 제대혈 이식(UCBT)을 이용하는 치료는 초기 유아형 및 후기 유아형 크라베병을 앓고 있는 대상체에서 인지를 보존하고, 수명을 연장하는데 효과적일 수 있다. UCBT는 신경학적 징후의 개시 이전에 뇌 변성의 진행을 중단시킴에도 불구하고, 발병한 환자에서 심각한 운동 장애를 초래하는 말초 신경 질환을 징후를 치료하는 데는 효과적이지 않다.

**발명의 내용**

[0007] 본 출원에서 크라베병을 치료하기 위한 신규한 방법이 제공된다. 몇몇 예에서, 그러한 방법은 대상체를 면역억제하는 단계, 치료 유효량의 제대혈을 상기 대상체에게 투여하는 단계(예를 들어, UCBT를 수행하는 단계), 및 치료 유효량의, 갈락토세레브로시다아제(GALC)를 코딩하는 핵산 분자를 상기 대상체에게 투여하는 단계(예를 들어, GALC 발현을 증가시키기 위해)를 포함한다. 처리된 대상체는 임의 형태의 크라베병, 예를 들어 초기 유아형 크라베병, 후기 유아형 크라베병, 또는 청소년 크라베병을 보유할 수 있다. 몇몇 예에서, 상기 대상체는 초기 유아형 크라베병을 보유하고, 6개월 미만의 인간 유아이다.

[0008] 몇몇 예에서, 제대혈은 GALC를 코딩하는 핵산 분자 이전, 예를 들어 GALC를 코딩하는 핵산 분자 이전의 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 또는 적어도 96시간에 투여된다. 몇몇 예에서, 제대혈은 대상체에 대해 동종이계이다. 몇몇 예에서, HLA-매칭된 공여자는 처리된 대상체에 대해 6개의 HLA 마커 중 적어도 4개와 일치한다. 몇몇 예에서, 적어도  $3 \times 10^7$ /kg 조정 이상 체중(AIBW)의 총 유효 세포 용량이 대상체에게 투여된다.

[0009] GALC를 코딩하는 핵산은 처리된 대상체에 일치될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 처리하려는 대상체가 고양이인 경우, 고양이 GALC 코딩 서열이 사용될 수 있고, 및 처리하려는 대상체가 인간인 경우, 인간 GALC 코딩 서열이 사용될 수 있다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 1에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 보유한다. 몇몇 예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 포함하는 GALC 단백질을 코딩한다. GALC를 코딩하는 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 예를 들어 네이키드 DNA로서 직접 투여될 수 있거나, 또는 벡터, 예를 들어 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예를 들어 혈액-뇌 장벽을 횡단할 수 있는 것, 예를 들어 아데노 연관 벡터(AAV), 예를 들어 AAV 혈청형 rh.10의 일부분으로서 투여될 수 있다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 바이러스 벡터의 일부분인 경우, 대상체당 적어도  $2 \times 10^{14}$  gc의 용량으로 투여된다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 바이러스의 일부분인 경우, 적어도  $1 \times 10^{11}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{12}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{13}$  gc/kg 또는 적어도  $1 \times 10^{14}$  gc/kg의 용량으로 투여된다.

[0010] 대상체는 UCBT 및 GALC를 코딩하는 핵산을 받기 이전에 면역억제될 수 있다. 몇몇 예에서, 그러한 단계는 치료 유효량의 알렘투주맙, 히드록시우레아, 플라다라빈, 및 부셀판을 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 예에서, 그러한 단계는 GVHD를 감소시키는 시약의 투여, 예를 들어 치료 유효량의 타크롤리무스 및 미코페놀레이트 모페틸(MMF)의 투여를 포함한다.

[0011] 크라베병을 치료하기 위한 방법 이외에, 본 출원은 대상체, 예를 들어 포유동물 대상체에서 유전병을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 유전자 치료에 사용된 시약(예를 들어, 유전자 치료의 시행 시까지 대상체에 의해 이전에 생성되지 않은 새로운 단백질 또는 바이러스 벡터 단백질)에 대한 원하지 않는 면역 반응(예를 들어, 항체 형성)을 감소시킨다. 임의의 유전 질환은 그러한 방법으로 치료될 수 있다. 몇몇 예에서, 유전자 치료는 단백질의 발현을 증가시키거나, 단백질의 발현을 감소시키거나, 게놈 서열 에러를 교정하거나, 또는 이의 조합이다. 그러한 방법은 대상체에서 골수를 제거하는 단계(예를 들어, 화학요법, 방사선 조사, 또는 둘 다를

이용함), 및 후속적으로 대상체에게 치료 유효량의 조혈모세포(HSC)를 투여하여 대상체가 새로운 면역계를 보유하도록 하는 단계를 포함한다. 몇몇 예에서, 대상체에게는 치료 유효량의 면역억제제가 투여되고, 이어서 HSC가 투여된다. (환자의 면역계의 회복 이전일 수 있는) HSC의 투여 후, 상기 방법은 대상체에게 치료 유효량의 치료 적 핵산 분자를 투여하는 것을 포함하는데, 이때 상기 핵산 분자는 (예를 들어, 상실 단백질을 발현시킴으로써) 유전병을 교정한다.

[0012] 본 발명의 상기한 목적 및 다른 목적은 첨부 도면을 참조하여 후술하는 상세한 설명으로부터 명백하게 될 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] **도 1. 인간 GALC(hGALC)를 발현하는 AAVrh.10의 게놈 구조.** AAVrh.10-hGALC로 지정된 벡터는 AAV2 역전된 말단 반복부(ITR), CAG 프로모터, 전장 인간 GALC cDNA, 및 래빗 β-글로빈 폴리A를 함유한다. CAG 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 인핸서, 병아리 β-액틴 프로모터 및 스플라이스 도너, 및 래빗 β 스플라이스 억셉터로 구성된다. AAV2 기초한 게놈은 AAVrh.10 캡시드로 위형된다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는, 전장 인간 GALC cDNA가 임의 포유동물, 예를 들어 개, 고양이, 마우스, 래트 또는 돌고래로부터의 전장 GALC cDNA로 대체될 수 있음을 이해할 것이다.

### 도 2. BMT 및 정맥내 AAVrh.10-mGALC를 이용하는 트위처 마우스의 생존률.

PND 10일에 AAVrh.10-mGALC, PND 10일에 BMT(부설판 제거), 또는 BMT(부설판 제거) 직후 PND 10-12일에 AAVrh.10-mGALC로 처리된 마우스의 생존률. 수직의 청색 및 녹색 증가는 마우스가 아직 생존하고 있음을 나타내고, 적색 증가는 분석을 위해 마우스가 희생되었음을 나타낸다. 별표는 위장 합병증으로 사망한 마우스를 나타낸다. 주목할 점은, 마우스는 더 오래 생존함에도 불구하고, AAVrh.10-mGALC 단독으로 처리한 마우스의 평균 생존 연령은 약 70-75일이라는 점이다(참조: Rafi *et al.*, *Mol. Ther.* 23:1681-90, 2015).

**도 3A-3F. BMT + AAV를 이용하여 치료된 트위처 마우스의 말초신경계의 병리학적 연구.** BMT 단독 또는 BMT + AAV로 처리한 트위처 마우스의 좌골 신경으로부터의 항 절편은 병에 걸렸으나 치료하지 않은 트위처 및 야생형 마우스의 유사한 절편과 비교하였다. 모든 이미지는 록솔-페스트 블루/페리오드산 쉬리프(원래 배율 ×1,000)로 염색된 파라핀 절편으로부터 얻은 것이다. 야생형 마우스(a)는 정상적인 미엘린화를 나타내나, 42일령의 미처리된 병에 걸린(트위처) 마우스(b)는 본질적으로 미엘린이 없고, 다수의 대식세포를 보유한다. BMT 단독으로 처리한 98일령 트위처 마우스는 본질적으로 모든 미엘린이 상실되었고, 이는 치료하지 않은 트위처 마우스에 필적하는 것이다. 대조적으로, 조합된 BMT/AArh10으로 처리한 상이한 연령의 마우스(d-f)는 완전히 정상적인 미엘린으로 보였고, 이는 야생형 마우스에 필적한다(참조: Rafi *et al.*, *Mol. Ther.* 23:1681-90, 2015).

**도 4. 제대 혈액 이식 후 크라베병 영아들의 신경 발달 결과.** 특이 라인은 각각의 환자의 발달을 나타낸다. 흑색 라인(아래)은 유아로서 이식을 경험한 징후를 보이는 환자를 나타내고, 및 착색된 라인은 유아로서 이식을 경험한 징후를 보이지 않는 환자를 나타낸다. 녹색 사선 라인은 병에 걸리지 않은 영아의 전형적인 발달을 나타낸다. 빗금 친 부분은 병에 걸리지 않은 영아의 전형적인 발달에서의 변동성을 나타낸다(참조: Escolar *et al.*, *NEJM*, 352:2069-81, 2005).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] **서열목록**

[0015] 첨부되는 서열목록에 목록화된 핵산 및 아미노산 서열은 37 C.F.R. 1.822.에 정의된 바와 같이 뉴클레오티드 염기를 위한 표준 문자 약어, 및 아미노산을 위한 3문자 코드를 이용하여 나타낸다. 각각의 핵산 서열의 단지 한 스트랜드를 나타내지만, 상보적인 스트랜드도 표시된 스트랜드에 대한 임의의 참조로서 포함되는 것으로 이해된다. 서열목록은 파일명 "sequence listing.txt"(~40 kb)의 형태인 ASCII 텍스트 파일이고, 이는 2017년 12월 18일에 생성된 것이며, 본 출원에 참고로 인용된다.

[0016] 서열번호 1 및 2는 각각 인간 GALC 핵산 및 단백질 서열이다(각각 GenBank® Accession No. NM\_000153.3 및 NP\_000144.2)이다.

[0017] 서열번호 3 및 4는 AAVrh.10의 캡시드의 예시적인 핵산 및 단백질 서열이다(각각 GenBank Accession No. AY243015.1 및 AA088201.1).

- [0018] 상세한 설명
- [0019] 달리 언급하지 않으면, 기술 용어는 통상적인 사용법에 따라 사용된다. 분자생물학의 공통 용어에 대한 정의는 문헌[참조: Benjamin Lewin, *Genes VII*, 옥스퍼드 유니버시티 프레스에서 출판, 1999; Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 블랙웰 사이언스 엘티디에서 출판, 1994; 및 Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH 퍼블리셔즈, 인크.에서 출판, 1995]; 및 다른 유사한 참고문헌에서 확인할 수 있다.
- [0020] 본 출원에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 명백히 달리 언급하지 않는 한 단수뿐만 아니라 복수 둘 다를 의미한다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다(comprise)"는 "포함하다(include)"를 의미한다. 따라서, "핵산을 포함하는(comprising)"은 다른 요소를 제외하지 않으면 "핵산을 포함하는(including)"을 의미한다. 핵산에 대해 언급한 임의의 및 모든 염기 크기는 근사치이고, 달리 언급하지 않으면, 설명 목적을 위해 제공된다. 다수의 방법 및 이와 유사하거나 동등한 것이 본 출원에 기재됨에도 불구하고, 특히 적합한 방법 및 물질이 후술된다. 충돌하는 경우, 용어 설명을 포함하는 본 명세서는 조절할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이고, 제한적인 의미는 아니다. 목록화된 특허 출원 및 특허, GenBank® Accession No.(2017년 1월 20일부터)와 관련된 서열은 본원에 전적으로 참고로 인용된 것이다.
- [0021] 본 발명의 다양한 실시양태의 검토를 용이하게 하기 위해, 특정 용어에 대한 설명을 후술한다:
- [0022] **투여:** 대상체에게 제제, 예를 들어 면역억제제, 제대혈, HSC, GALC를 코딩하는 핵산 분자 또는 다른 치료적 핵산 분자, 또는 다른 치료제를 임의의 효과적인 경로에 의해 제공하거나 부여하는 것. 예시적인 투여 경로는 주사(예를 들어, 피하, 근육내, 피부내, 복강내, 척추강내, 골내, 및 정맥내), 경피, 비강내, 및 흡입 경로를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0023] **접촉:** 고체 형태 또는 액체 형태를 포함하는 직접적인 물리적 결합으로 배치. 접촉은, 예를 들어 시약을 샘플(예를 들어, 제대혈을 포함하는 샘플)에 첨가함으로써 시험관 내 또는 생체 외에서, 또는 대상체에 투여함으로써 생체 내에서 발생할 수 있다.
- [0024] **유효량:** 유의한 또는 원하는 결과를 나타내기 위해 충분한 제제(예를 들어, 면역억제제, 제대혈, HSC, GALC를 코딩하는 핵산 분자 또는 다른 치료적 핵산 분자)의 양.
- [0025] 유효량(치료 유효량으로도 언급함)은 대상체 및 치료하려는 질병 상태, 대상체의 체중 및 연령, 질병 상태의 중증도, 투여 방식 등 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있는데, 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 유의한 치료 효과는 진단 결정의 가능성; 질병, 징후, 질환, 또는 병리학적 상태의 경감; 질병, 징후, 장애 또는 상태의 개시의 감소 또는 예방; 및 질병, 징후, 질환 또는 병리학적 상태에의 일반적인 대응을 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 하나 이상의 면역억제제의 "유효량"은 골수억제, 예를 들어 적어도 99%까지의 백혈구 감소(면역억제제(들)를 투여하지 않은 경우와 비교)를 달성하기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 제대혈의 "유효량"은 RIC UCBT 후 +14-15일의 중간에 이식을 달성하기 위해 적어도  $3 \times 10^7$  총 유핵 세포(TNC)/kg(3천만/kg) 수용체 체중, 예를 들어 적어도 5천만/kg, 또는 적어도 1억/kg이다. 하나의 실시양태에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 T 세포에서 GALC의 발현 및/또는 활성을 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 생존 시간을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600%(면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다.
- [0026] 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 생존 시간을, 예를 들어 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년, 적어도 1.5년, 적어도 2년, 적어도 2.5년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년, 적어도 12년, 적어도 15년, 또는 적어도 20년 (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 CNS 및/또는 PNS의 세포의 미엘린

화를, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 CNS 및/또는 PNS에서 대식세포 침윤, 성상세포 증, 및/또는 CD68 염색을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 종양을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 체중을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 신경발달 기능을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가 또는 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 조기 학습(예를 들어, 유아 발달의 베일리 척도 또는 조기 학습의 물렌 척도(AGS ed.. Circle Pines, MN: American Guidance Service Inc.)에 의해 평가되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가 또는 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 운동 기술(예를 들어, 피바디 발달 운동 척도에 의해 평가되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가 또는 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자(예를 들어, 청소년 또는 성인 대상체)의 거동 징후를, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 시력을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 백질(예를 들어, 뇌의 MRI 또는 CSF 개방 압력에 의해 측정되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를

투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 두개내압(예를 들어, 뇌의 MRI에 의해 검출되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 처리 시간(예를 들어, 뇌의 MRI에 의해 검출되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자의 발작(예를 들어, 뇌의 MRI에 의해 검출되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% (면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 걸음걸이, 강직성, 섭식 능력, 미세 운동 기술, 적응 기능, 과민성, 자율신경장애, 수면, 또는 이의 조합을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600%(면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 개선시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역억제제(들), 제대혈, 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, GALC를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 크라베 환자에서 CSF 단백질의 레벨 및/또는 혈액/CSF 사이코신(예를 들어, 뇌의 MRI에 의해 검출되는 바와 같이)을, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%(면역억제제(들), 제대혈 및 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 몇몇 예에서, 이들 효과의 조합이 달성된다.

[0027] **갈락토세레브로시다아제(GALC)**: (예를 들어, OMIM 606890): 갈락토실세라미다아제로도 공지되어 있으며, 세라마이드 유도체로부터 갈락토오스를 제거하는 효소이다(EC 3.2.1.46). GALC 내의 돌연변이, 예를 들어 결실(예를 들어, 502/del 돌연변이), 삽입, 및 점 돌연변이는 크라베병과 관련되어 있다. Y158S 돌연변이는 개에서 관찰되어 왔고, 엑손 4의 cDNA 위치 387 및 388에 상응하는 AC의 결실은 레서스 원숭이에서 관찰되어 왔다.

[0028] GALC 서열은, 예를 들어 GenBank® 서열 데이터베이스(예를 들어, Accession No. NP\_000144.2, AAH36518.1, NP\_001003238.1, XP\_011281775.1, AAB71823.1, 및 NP\_001037727.1은 예시적인 GALC 단백질 서열을 제공하는 반면, Accession No. : NM\_000153.3, BC036518.2, NM\_001003238.1, XM\_011283473.1, AH005573.2 및 NM\_001044262.2는 예시적인 GALC 핵산 서열을 제공한다)로부터 공개 이용 가능하다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는 GALC 변이체를 포함하는 추가의 GALC 핵산 및 단백질 서열, 예를 들어 이들 GenBank® 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 것을 확인할 수 있다.

[0029] **조혈모세포(HSC)**: 모든 혈액 세포로 되는 줄기세포. 따라서, HSC는 생체 내에서 모든 혈액 계통을 지속적으로 생성할 수 있는 능력을 보유한다. 이들은 제대혈 및 골수(BM) 내에 존재한다. 몇몇 예에서, HSC는 CD34를 발현한다. 몇몇 예에서, HSC는 하기 마커를 발현한다:

[0030] 마우스 HSC: CD34<sup>10/-</sup>, SCA-1<sup>+</sup>, Flt-3<sup>+</sup>, C-Kit<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>

[0031] 인간 HSC: CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy1/CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>10/-</sup>, C-Kit/CD117<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup>, SLAM 분자.

[0032] **증가 또는 감소**: 각각 대조값(예를 들어, 치료제 없이 나타나는 값)으로부터 양적으로 통계학적으로 유의미한 긍정적인 또는 부정적인 변화. 증가는 긍정적인 변화이고, 예를 들어 대조값과 비교하여 적어도 50%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400% 또는 적어도 500% 증가이다. 감소는 부정적인 변화이고, 예를 들어 대조값과 비교하여 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 100% 감소이다. 몇몇 예에서, 감소는 100% 미만, 예를 들어 90% 이하, 95% 이하, 또는 99% 이하의 감소이다.

[0033] **단리된**: "단리된" 생물학적 성분(예를 들어, 핵산 분자 또는 단백질)은 상기 성분이 발생하는 유기체의 세포 또

는 조직 내의 다른 생물학적 성분, 예를 들어 다른 세포(예를 들어, RBC), 염색체 및 염색체의 DNA 및 RNA, 및 단백질로부터 실질적으로 분리되거나, 생성되거나, 또는 정제되어 왔다. "단리된" 핵산 및 단백질은 표준 정제 방법으로 정제된 핵산 및 단백질을 포함한다. 또한, 상기 용어는 숙주 세포 내에서 재조합 발현에 의해 제조된 핵산 및 단백질뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산 및 단백질도 포함한다.

**[0034] 크라베병:** 공세포백색질장애 또는 갈락토실세라마이드 지방증으로도 공지되어 있고, 신경계의 미엘린 수초에 영향을 미치는 희귀하고, 때로는 치명적인 퇴행성 질환이다. 크라베병은, 스펅고지방질의 이상 대사와 관련되어 있기 때문에, 스펅고지방증의 형태이다. 이 질병은 상염색체 열성 패턴으로 유전된다. 크라베병은 갈락토세레브로시다아제의 결핍을 초래하는 GALC 유전자(인간에서 염색체 14에 위치함(14q31)) 내의 돌연변이를 원인으로 한다. 인간 이외에, 크라베병은 고양이, 개(예를 들어, 웨스티 및 케언 테리어) 및 돌고래에서도 관찰되어 왔다.

**[0035]** 유아형 크라베병(예를 들어, 환자는 0-6개월임)의 증상은 과민성; 긴장항진; 말초 신경병증; 구토 및 다른 수유 곤란; 성장 장애; 늦은 발달; 원인불명의 발열; 및 진행성 근육 쇠약, 청력 상실 및 시력 상실을 포함할 수 있다. 후기 발병 형태는 유아기의 후기(후기 유아, 예를 들어 환자는 7-12개월임), 영아(후기 발병, 예를 들어 환자는 13개월 - 10살), 초기 청소년 또는 심지어 성인(예를 들어, 11살 또는 그 이상)까지 증상이 나타나지 않을 수 있다. 이러한 형태의 징후 및 증상은 가변적이지만, 근육 쇠약 및 강직; 보행 곤란; 시력 상실; 지적 퇴행; 및/또는 발작을 포함할 수 있다.

**[0036] 작동 가능하게 연결된:** 제1 핵산 서열은, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 위치되는 경우, 제2 핵산 서열과 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터는, 프로모터가 코딩 서열(예를 들어, GALC 코딩 서열)의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은, 동일한 리딩 프레임 내에서 2개의 단백질 코딩 영역을 결합할 필요가 있는 경우, 인접한다.

**[0037] 약학적으로 허용 가능한 담체:** 본 발명에서 유용한 약학적으로 허용 가능한 담체는 통상적인 것이다. 문헌[참조: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)]에는 치료제, 예를 들어 본 출원에 개시된 벡터, 혈액 세포, 핵산 분자, 또는 면역억제제의 약학적 전달을 위해 적합한 조성물 및 제제가 기재되어 있다.

**[0038]** 일반적으로, 담체의 특성은 사용되는 특정 투여 모드에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 비경구 제제는 일반적으로 약학적으로 및 생리적으로 허용 가능한 유체, 예를 들어 물, 생리 식염수, 균형잡힌 염 용액, 수성 텍스트로오스, 글리세롤 등을 비히클로서 포함하는 주사 가능한 유체를 포함한다. 생물학적으로 중성인 담체 이외에, 투여되는 약학 조성물은 소량의 비독성 보조 물질, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, 보존제, 및 pH 완충제 등, 예를 들어 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

**[0039] 프로모터:** 핵산의 전사를 유도하는 핵산 조절 서열의 어레이. 프로모터는, 전사 개시 부위 근처의 필요한 핵산 서열, 예를 들어 폴리머라아제 II 타입 프로모터의 경우, TATA 요소를 포함한다. 또한, 프로모터는 경우에 따라 원위 인핸서 또는 리프레서 요소를 포함하는데, 이들은 전사 개시 부위로부터 수천 염기쌍만큼 떨어져 위치될 수 있다.

**[0040]** 프로모터의 예로는 SV40 프로모터, CMV 인핸서-프로모터, 및 CMV 인핸서/b-액틴 프로모터를 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 구성적 및 유도성 프로모터 둘 다 본 출원에 제공된 방법에 사용될 수 있다(참조: 예를 들어, Bitter *et al.*, *Methods in Enzymology* 153:516-544, 1987). 또한, 프로모터-의존성 유전자 발현을 세포 유형 특이적, 조직 특이적으로 조절 가능하게 하거나, 또는 외부 신호 또는 제제에 의해 유도 가능하게 하기에 충분한 이들 프로모터 요소가 포함되고; 그러한 요소는 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치될 수 있다. 또한, 재조합 DNA 또는 합성 기법에 의해 생성된 프로모터도 핵산 서열의 전사를 수행하기 위해 사용될 수 있다.

**[0041] 재조합:** 재조합 핵산 분자 또는 단백질 서열은 자연적으로 발생하지 않는 서열, 또는 2개의 분리된 서열 세그먼트의 인공적인 조합(예를 들어, GALC 코딩 서열을 포함하는 바이러스 벡터)에 의해 제조된 서열을 보유하는 것이다. 상기 인공적인 조합은 일상적인 방법, 예를 들어 화학 합성 또는 핵산의 분리된 세그먼트의 인공적인 조작, 예를 들어 유전공학 기법에 의해 수행될 수 있다. 유사하게, 재조합 또는 트랜스제닉 세포는 재조합 핵산 분자를 함유하여 재조합 단백질을 발현하는 것이다.

**[0042] RNA 간섭(RNAi):** RNA 분자에 의해 매개되는 전사후 유전자 침묵 메커니즘. 짧은 RNA 분자의 세포 내로의 도입(예를 들어, 이중 가닥 RNA)은 다른 특정 메신저 RNA(mRNA) 분자에 대한 상기 RNA 분자의 결합을 초래하여, 예

를 들어 mRNA가 단백질을 생성하지 못하게 함으로써 그들의 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 억제성 RNA 분자의 예는 작은 간섭 RNA(siRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 리보자임(예를 들어, 해머헤드 리보자임, VS 리보자임, 또는 헤어핀 리보자임), 및 안티센스 분자를 포함한다. 특정 예에서, RNAi 분자는 타겟 유전자, 예를 들어 유전병을 가진 대상체에서 발현이 원하지 않게 상향조절되는 유전자에 대해 유도된다(따라서, 그 발현은 감소시키는 것이 바람직하다). 몇몇 예에서, RNAi 분자는 길이가 적어도 약 19 뉴클레오티드(nt), 예를 들어 적어도 20, 적어도 21, 적어도 22, 적어도 23, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 26, 또는 적어도 27 nt이다.

[0043] **서열 동일성:** 아미노산(또는 뉴클레오티드) 서열 사이의 유사성은, 서열 동일성에 대해 달리 언급하지 않으면, 서열들 사이의 유사성의 관점에서 언급된다. 서열 동일성은 종종 동일성 퍼센트(또는 유사성 또는 상동성의 관점에서 측정되고; 퍼센트가 높을수록 서열 2개는 더 유사하다. 폴리펩티드의 동족체는, 표준 방법을 이용하여 정렬하는 경우, 상대적으로 더 높은 정도의 서열 동일성을 보유할 것이다.

[0044] 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 공지되어 있다. 여러 가지 프로그램 및 정렬 알고리즘은 문헌(참조: Smith 및 Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman 및 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson 및 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins 및 Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; 및 Pearson 및 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988) 에 기재되어 있다. 문헌(참조: ATSC *et al.*, *Nature Genet.* 6:119, 1994)은 서열 정렬 방법 및 상동성 계산의 상세한 내용을 제시한다.

[0045] NCBI의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(참조: ATSC *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990)은 서열 분석 프로그램 blast, blast, blast, blast 및 blast와 함께 사용하기 위해 미국 국가생물공학센터(NCBI, Bethesda, MD)를 포함하는 몇몇 소스 및 인터넷상에서 얻을 수 있다. 이들 프로그램을 이용하여 어떻게 서열 동일성을 결정하는지에 대한 기재는 인터넷상의 NCBI 웹페이지 상에서 얻을 수 있다.

[0046] 천연 GALC 단백질 또는 코딩 서열의 변이체는 디폴트 파라미터로 설정된 NCBI Blast 2.0, gapped blastp를 이용하여 아미노산 서열과 전장 정렬에 의해 확인하는 경우, 적어도 약 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 것을 특징으로 한다. 약 30개의 아미노산을 초과하는 아미노산 서열의 비교를 위해, 디폴트 파라미터, 즉 (gap existence cost: 11, 및 per residue gap cost: 1)로 설정된 디폴트 BLOSUM62 매트릭스를 이용하는 Blast 2 서열 기능이 이용된다. 짧은 펩티드(약 30 아미노산보다 적은 펩티드)를 정렬하는 경우, 상기 정렬은 디폴트 파라미터(open gap 9, extension gap 1 penalties)로 설정된 PAM30 매트릭스를 이용하는 Blast 2 서열 기능을 사용하여 수행되어야 한다. 참조 서열에 대해 훨씬 더 큰 유사성을 가진 단백질은, 이 방법으로 평가하는 경우, 증가하는 퍼센트 동일성, 예를 들어 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 나타낼 것이다. 전체 서열 미만이 서열 동일성을 위해 비교되는 경우, 동족체 및 변이체는 전형적으로 10-20 아미노산의 짧은 윈도우에 비해 적어도 80%의 서열 동일성을 보유할 것이고, 및 참조 서열에 대한 그들의 유사성에 기초하여 적어도 85% 또는 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 보유할 수 있다. 그러한 짧은 윈도우에 대해 서열 동일성을 결정하기 위한 방법은 인터넷상의 NCBI 웹사이트에서 이용할 수 있다. 이들 서열 동일성 범위는 단지 지침을 위해 제공되는 것이고; 제공된 범위 외에 속하는 매우 유의미한 동족체가 얻어질 수 있는 것도 가능하다.

[0047] 따라서, 본 발명의 방법과 함께 사용될 수 있는 변이체 GALC 단백질 또는 핵산 서열은 서열번호 1 또는 2, 뿐만 아니라 본 출원에 제공된 GenBank® Accession No.로 나타난 임의의 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유할 수 있다.

[0048] **대상체:** 포유동물, 예를 들어 인간. 포유동물은 쥐과동물, 유인원, 인간, 가축, 스포츠 동물, 및 애완동물을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 하나의 실시양태에서, 대상체는 비인간 포유동물 대상체, 예를 들어 원숭이 또는 다른 비인간 영장류, 마우스, 래트, 래빗, 돼지, 염소, 양, 돌고래, 개, 고양이, 말 또는 소이다. 몇몇 예에서, 상기 대상체는 실험실 동물/유기체, 예를 들어 마우스, 래빗, 또는 래트이다. 몇몇 예에서, 본 출원에 개시된 방법을 이용하여 치료된 대상체는 6개월 미만의 인간 유아이다.

[0049] 몇몇 예에서, 상기 대상체는 크라베병, 예를 들어 본 출원에 개시된 방법을 이용하여 치료될 수 있는 유아형 크라베병을 보유한다. 몇몇 예에서, 본 출원에 개시된 방법을 이용하여 치료된 대상체는 유전병을 보유하는 인간 대상체이다.

[0050] **치료제:** 대상체에 투여 시 몇몇 유의한 효과를 부여하는 1종 이상의 분자 또는 화합물. 유의한 치료 효과는 진

단 결정의 가능성; 질병, 징후, 질환, 또는 병리학적 상태의 경감; 질병, 징후, 장애 또는 상태의 개시의 감소 또는 예방; 및 질병, 징후, 질환 또는 병리학적 상태에 대한 일반적인 대응을 포함한다.

- [0051] **형질도입된 및 형질전환된:** 바이러스 또는 벡터는, 그들이 세포 내로 핵산을 전달하는 경우, 세포를 "형질도입"시킨다. 세포는, 상기 핵산 분자가 세포에 의해, 세포성 게놈 내로 상기 핵산의 통합에 의해, 또는 에피솜 복제에 의해 안정하게 복제되는 경우, 세포 내에 형질도입된 핵산에 의해 "형질전환" 또는 "형질감염"된다.
- [0052] 다수의 형질감염 방법을 사용할 수 있다: 예를 들어, 화학적 방법(예를 들어, 칼슘-포스페이트 형질감염), 물리적 방법(예를 들어, 전기천공법, 미세주입, 입자 충격), 융합(예를 들어, 리포솜), 수용체-매개된 세포내 도입(예를 들어, DNA-단백질 복합체, 바이러스 헵막/캡시드-DNA 복합체) 및 바이러스, 예를 들어 재조합 바이러스에 의해 생물학적 감염[참조: Wolff, J. A., ed, Gene Therapeutics, Birkhauser, Boston, USA (1994)].
- [0053] **트랜스유전자:** 벡터에 의해 공급된 외인성 유전자. 한 예에서, 트랜스 유전자는, 예를 들어 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 GALC 코딩 서열(또는 다른 치료적 핵산 분자, 예를 들어 유전자, 코딩 서열 또는 억제성 RNA 분자)를 포함한다.
- [0054] **이식:** 하나의 신체 또는 그 신체의 부분으로부터 다른 신체 또는 그 신체의 부분으로 조직 또는 장기 또는 세포(예를 들어, HSC)의 전달. "동종이계 이식" 또는 "이종성 이식"은 한 대상체로부터 다른 대상체로의 이식이고, 이때 상기 대상체들은 두 대상체에서의 서열이 동일하지 않은 하나 이상의 좌위(loci)에 유전자를 보유한다. 동종이계 이식은 유전적으로 상이한 동일한 종의 두 대상체, 또는 2개의 상이한 종의 대상체들 사이에서 일어날 수 있다. "자가 이식"은 동일한 대상체 내의 한 위치에서 다른 위치로의 조직 또는 세포의 이식, 또는 한 대상체에서 다른 대상체로의 조직 또는 세포의 이식인데, 이때 두 대상체는 유전적으로 동일하다.
- [0055] **치료하는, 치료, 및 치료법(요법):** 손상, 병리학 또는 상태의 감쇠 또는 경감의 성공 또는 성공의 지표를 의미하는데, 이는 증상의 감소, 차도, 완화, 또는 환자가 상태를 더 견딜 수 있도록 하는 것, 퇴행 또는 감소 속도의 둔화, 퇴행의 종말점을 덜 쇠약하게 하는 것, 대상체의 신체적 또는 정신적 웰빙을 개선시키는 것, 또는 생존 기간을 연장시키는 것과 같은 임의의 객관적인 또는 주관적인 파라미터를 포함한다. 치료는 객관적인 또는 주관적인 파라미터에 의해 평가될 수 있는데, 이는 신체검사, 혈액 및 다른 임상 테스트의 결과를 포함한다. 몇몇 예에서, 본 출원에 개시된 방법을 이용하는 치료는 유전병과 관련된 증상의 수 또는 중증도의 감소, 예를 들어 유전병을 보유하는 처리된 환자의 생존 시간의 증가를 달성한다.
- [0056] 몇몇 예에서, 본 출원에 개시된 방법을 이용하는 치료는 크라베병과 관련된 증상의 수 또는 중증도의 감소, 예를 들어 치료된 크라베병 환자의 생존 시간의 증가, 치료된 크라베병 환자의 CNS 및/또는 PNS에서 세포의 미엘린화의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 신경발달 기능의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 조기 학습(예를 들어, 물레 또는 베일리 척도에 의해 평가되는 바와 같음), 치료된 크라베병 환자의 CNS 및/또는 PNS에서 대식세포 침윤, 성장교세포증, 및/또는 CD68 발현의 감소, 치료된 크라베병 환자에서 종양의 감소, 치료된 크라베병 환자의 체중의 증가, 및/또는 치료된 크라베병 환자에서 운동 기술(예를 들어, 피바디 발달 운동 척도에 의해 평가되는 바와 같음)의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 수영의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 미세 운동 기술의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 인지 및 적응 기능의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 시력 및 청력의 개선, 치료된 크라베병 환자 뇌 MRI의 변화, 치료된 크라베병 환자에서 신경 전도의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 CSF 단백질의 감소, 치료된 크라베병 환자에서 사이코신 및 질병 진행의 임의의 바이오마커의 감소, 치료된 크라베병 환자에서 발작의 감소, 치료된 크라베병 환자에서 과민성의 감소, 치료된 크라베병 환자에서 수면의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 두개내압의 개선, 치료된 크라베병 환자에서 보행의 개선, 및 치료된 크라베병 환자에서 거동 문제의 감소를 달성할 수 있다. 몇몇 예에서, 이들 효과의 조합이 달성된다.
- [0057] **체대혈(UCB):** 태반내 및 출생 후 부착된 탯줄 내에 잔류하는 혈액. UCB는 전혈 내에서 확인되는 모든 요소, 예를 들어 적혈구, 백혈구, 혈장, 혈소판 및 조혈 줄기 세포를 함유한다.
- [0058] **~에 충분한 조건 하에서:** 원하는 활성을 허용하는 임의의 환경을 기재하기 위해 사용된 문구이다. 한 예에서, 상기 원하는 활성은 GALC 또는 질병을 치료하기 위해 필요한 다른 단백질의 증가된 발현 또는 활성이다. 한 예에서, 상기 원하는 활성은, 예를 들어 본 출원에 개시된 방법을 이용하여 생체 내에서 크라베병과 같은 유전병(또는 표 1에 목록화된 다른 유전병)의 치료 또는 진행의 둔화이다.
- [0059] **벡터:** 숙주 세포 내로 도입됨으로써 형질전환된 숙주 세포를 생성하는 핵산 분자. 벡터는 숙주 세포 내에서 복제를 가능하게 하는 핵산 서열, 예를 들어 복제 원점을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는, 예를 들어 프로모터 및/또는 선택 가능한 마커 유전자, 및 당해 기술분야에 공지된 임의의 유전 요소와 함께 GALC 코딩 서열(또는 다른

치료적 핵산 분자)을 포함할 수 있다. 박터는 세포를 형질도입, 형질전환 또는 감염시킴으로써 세포가 세포 고유의 것과는 다른 핵산 및/또는 단백질을 발현하도록 할 수 있다. 경우에 따라 박터는 세포 내로의 핵산의 도입에 조력하는 물질, 예를 들어 바이러스 입자, 리포좀, 단백질 코팅 등을 포함한다.

[0060] **개관**

[0061] 크라베병(공세포백색질장애로도 칭함)은 희귀 유전 신경퇴행성 질환으로서, 100,000 내지 250,000명의 출산 중 1명의 비율로 발생하는 것으로 추산된다. 상기 질병은 모든 인종과 민족에서 발견되고, 미엘린의 중요한 갈락토리피드 성분의 정상적인 이화작용을 위해 필수적인 리소좀 효소 갈락토세레브로시다아제(GALC)를 코딩하는 유전자 내의 돌연변이에 의해 유발된다. GALC 활성의 결핍은 미엘린화 신경교 세포를 손상시켜 염증, 신속한 탈미엘린화, 및 중추신경계(CNS) 및 말초 신경계(PNS)의 진행성 악화를 야기하는 특정 갈락토리피드의 축적을 초래한다(Wenger *et al.*(2013). Scriver's The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease(OMMBID). 챕터 147 크라베병(공세포백색질장애)). 상기 질병의 고전적인 조기 유아형 형태에서, 환자들은 생후 최초 6개월 내에 강직, 발달 지연, 및 과민성을 나타낸다. 백질의 상실은 심각한 운동 및 정신적 악화를 유도하고, 2살까지는 사망한다. 환자의 대략 10%는 상기 질병의 후기 발병 형태(후기 유아, 청소년, 및 성인)이고, 운동실조, 쇠약, 시력 문제, 강직성 마비, 거동 문제, 및 치매를 나타낼 수 있다. 몇몇 유전형은 후기 발병하는 덜 심각한 질병을 유도하고, 이는 소량의 잔류 GALC 활성과 관련이 있다.

[0062] GALC 유전자에서 확인된 147개의 질병 유발 돌연변이 중에서, 몇몇은 조기- 또는 후기-개시 질병과 명백히 관련되어 있다. 다른 경우에서, 강한 유전형-표현형 상관관계는 아직 잘 확립되어 있지 않다. 대부분의 환자는, 크라베병의 가족력이 없는 경우, 이미 증상이 있는 경우에 진단되고, 유아형 크라베병에서 개시 연령은, 그들이 동일한 GALC 돌연변이를 공유하는 경우, 유사하다.

[0063] 사전 증상 및 최소한의 증상을 나타내는 크라베병 환자 치료를 위한 현행 치료법은 대부분 통상적으로 제대혈 이식(UCBT)의 형태인 조혈모세포 이식(HSCT)을 시행하는 것이다. 그러나, 이 방법은 단점이 있다. 한 가지 중요한 단점은 HSCT 단독으로는 병에 걸린 대상체의 장애의 주 원인인 말초 신경 질환의 진행을 경감 또는 둔화시키는 것으로 확인되지 않고 있다는 것이다. 아울러, 상기 치료가 자연적인 질병의 진행을 변경시킴에도 불구하고, 환자들은 악화되고, 십대 후반에는 사망할 것이다(Gupta *et al.*, *NeuroImage: Clinical*. 7:792-8, 2014). 또한, UCBT는, 일단 환자가 이미 증상을 나타내는 경우에는 유의미한 이점을 제공하지 않는데, 그 이유는 운동로에 대한 광범위한 조기 손상때문이다. 따라서, 일단 환자가 크라베병의 징후 또는 증상을 나타내는 경우, 이 용할 수 있는 효과적인 치료법은 없다.

[0064] 본 출원에서, UCBT, 및 GALC의 발현을 증가시키는 유전자 치료 둘 다를 이용하는, 크라베병을 치료하기 위한 신규한 방법이 제공된다. GALC를 발현시키는 것은 진단 및 신경계에 대한 GALC 이용 가능성 사이의 간격을 단축시킴으로써 UCBT 단독과 비교하여 더 양호하게 CNS 및 PNS의 미엘린화를 교정하고, 및 크라베병의 표현형을 경감시킬 수 있음을 제안한다. 다른 사람들은 자가 제대혈 이식 및 국소 렌티바이러스 형질감염을 제안하여 왔다. 대조적으로, 몇몇 예에서, 본 발명은 동종이계(혈연관계가 아니 공여자) 제대혈 이식 및 정맥내 아테노 연관 바이러스 박터 형질감염을 이용하여 GALC를 발현한다. 상기 방법은 면역억제된 대상체에서 시행되는데, 상기 대상체는 GALC 단백질에 대한 항체의 형성을 감소시키거나 예방할 수 있다. 그러한 방법은 말초 신경 기능을 개선하고, 수명을 연장시킬 수 있다.

[0065] 본 출원에서, 대상체, 예를 들어 유아에서 크라베병을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 대상체를 면역억제(예를 들어, 골수억제)시키는 단계, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제대혈(UCB)을 투여하는 단계, 및 상기 대상체에게 치료 유효량의 핵산 분자(GALC)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0066] 대상체를 면역억제하는 것은, 예를 들어 치료 유효량의 알렘투주맙, 히드록시우레아, 플루다라빈, 및 부설관을 투여함으로써 대상체를 골수억제하거나, 골수제거하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 타크롤리무스 및 미코페놀레이트 모페틸(MMF)을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0067] 몇몇 예에서, UCB는 GALC를 코딩하는 핵산 분자 이전에, 예를 들어 적어도 6시간 전, 적어도 12시간 전, 적어도 1일 전, 적어도 2일 전, 적어도 3일 전, 적어도 4일 전, 적어도 5일 전, 적어도 6일 전, 또는 적어도 7일 전에 투여된다. 몇몇 예에서, UCB는 대상체에 대해 동종이계이고, 및 예를 들어 6개의 HLA 마커 중 4, 5 또는 6개와 일치한다. 몇몇 예에서, 치료 유효량의 UCB를 투여하는 것은 대상체에게 적어도 310<sup>7</sup>/kg 조정 이상 체중(AIBW)의 총 유핵 세포 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0068] 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호 1에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도

95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 공유한다. 몇몇 예에서, 상기 핵산 분자는 서열 번호 2에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 보유하는 GALC 단백질을 코딩한다. GALC 코딩 서열은 크라베병과 관련된 것으로 공지된 돌연변이를 포함하지 않는다. GALC를 코딩하는 핵산 분자는 프로모터, 예를 들어 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 한 예에서, 프로모터는 CAG 프로모터(참조: 도 1). GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 예를 들어 바이러스 벡터와 같은 벡터의 일부분일 수 있는데, 이는 혈액-뇌 장벽을 횡단할 수 있는 것이다. 특정 예에서, 바이러스 벡터는 아데노 연관 벡터(AAV), 예를 들어 AAV 혈청형 rh.1이다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 예를 들어 대상체 당 적어도  $1 \times 10^{11}$  게놈 카피(gc), 적어도  $1 \times 10^{12}$  gc, 적어도  $2 \times 10^{12}$  gc, 적어도  $1 \times 10^{13}$  gc, 적어도  $2 \times 10^{13}$  gc, 또는 대상체당 적어도  $1 \times 10^{14}$  gc, 예를 들어 대상체당  $2 \times 10^{11}$  gc, 대상체당  $2 \times 10^{12}$  gc, 대상체당  $2 \times 10^{13}$  gc, 또는 대상체당  $2 \times 10^{14}$  gc의 용량으로 정맥내 투여된다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 적어도  $1 \times 10^{11}$  gc/kg, 적어도  $5 \times 10^{11}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{12}$  gc/kg, 적어도  $5 \times 10^{12}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{13}$  gc/kg, 또는 적어도  $4 \times 10^{13}$  gc/kg, 예를 들어  $4 \times 10^{11}$  gc/kg,  $4 \times 10^{12}$  gc/kg, 또는  $4 \times 10^{13}$  gc/kg의 용량으로 정맥내 투여된다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 정맥내 투여된다.

[0069] **크라베병의 치료 방법**

[0070] 본 출원에서, 대상체, 예를 들어 유아에서 크라베병을 치료하기 위한 방법이 제공된다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 대상체를 면역억제(예를 들어, 골수억제)시키는 단계, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제대혈(UCB)을 투여하는 단계, 및 상기 대상체에게 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하는 단계(예를 들어, 이때 GALC는, 정상적인 야생형 GALC 핵산 분자와 같이, 크라베병과 관련된 돌연변이를 포함하지 않는다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 자가 공여자로부터의 UCBT 후, GALC 유전자를 보유하는 AAV 혈청형 rh.10 벡터(AAVrh.10-GALC)를 정맥내 주입하는 것을 포함한다. 그러한 치료는 뇌 및 말초 신경에서 미엘린화를 개선함으로써 운동 악화를 중단시키는 한편, 환자의 면역계를 재구성함으로써 치료 결과를 개선시킨다.

[0071] **대상체**

[0072] 치료하려는 대상체는 임의의 형태의 크라베병을 가진 임의의 포유동물일 수 있다. 따라서, 조기 유아형 크라베병, 또는 청소년기 크라베병을 앓고 있는 인간, 고양이 및 개가 본 출원에 개시된 방법으로 치료될 수 있다. 몇몇 예에서, 대상체들은 조기 유아형 크라베병을 보유하고, 6개월 미만의 인간 유아이다. 몇몇 예에서, 대상체는 후기 유아형 크라베병을 보유하고, 1살 미만의 인간 유아이다.

[0073] **면역제거**

[0074] 개시된 방법으로 치료하려는 대상체에게는 그들의 면역계를 억제하는 치료, 예를 들어 면역계를 억제하고/거나 골수를 파괴하기 위해 사용되는 치료를 시행할 수 있다. 그러한 면역제거는 UCBT 이전 및 GALC 코딩 서열을 투여하기 이전에 수행되는데, 이는 바람직하지 않은 면역 반응을 감소시키거나 제거할 수 있다. 따라서, 몇몇 예에서, UCBT 및 GALC 코딩 서열을 받는 대상체에게는 이전에 면역제거 레지먼, 예를 들어 골수 내의 조혈 세포를 근절하여 결과적으로 투여 시로부터 1 내지 3주 내에 심각한 범혈구감소증을 초래할 것으로 예상되는 최대 용인 용량으로 투여되는 화학요법제, 또는 이전에 비면역제거 레지먼, 예를 들어 수용자 골수를 일부 제거하지만 근절하지는 않을 것으로 예상되는 화학요법 또는 전신 조사의 감소된 용량이 투여된다. 몇몇 예에서, 수용자 대상체에게는, UCBT 및 GALC 코딩 서열을 투여하기 이전에, 수용자 면역계, 예를 들어 T 세포를 감소시키거나 제거할 치료법이 시행된다.

[0075] 사용될 수 있는 화학치료제의 예로는 카르무스틴, 부설판, 카르보플라틴, 시클로포스파미드, 시톡산, 에토포시드, 플루다라빈, 펠팔란, 메토크세이트, 티오테파, 토포테칸, 또는 이의 조합을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 한 예에서, 대상체는 치료 유효량의 부설판으로 치료된다. 한 예에서, 대상체는 치료 유효량의 알렘투주맙, 히드록시우레아, 플루다라빈, 및 부설판으로 치료된다.

[0076] 몇몇 예에서, 본 출원에 개시된 방법으로 치료하려는 대상체는 조사되는데, 예를 들어 3~일에 걸쳐서 1200 내지 1300 센티그레이가, 예를 들어 UCBT 및 GALC 코딩 서열을 투여하기 이전에, 조사된다.

[0077] 몇몇 예에서, 면역제거는 이식편 대 숙주 질병을 감소시키는 제제, 예를 들어 치료 유효량의 타크롤리무스, 치료 유효량의 미코페놀레이트 모페틸(MMF), 또는 둘 다를 이용하는 치료를 포함한다.

- [0078] 성공적인 골수제거는 전적으로 숙주 T 세포 회복의 부재이다. 즉, T 세포 키메라즘이 100% 숙주가 아닌 한, 골수제거는 성공적이다. 몇몇 경우에서, 일부 숙주 T 세포는 ~50%로 관찰되지만, 이는 시간 경과에 따라 감소한다.
- [0079] UCBT
- [0080] 조혈모세포 이식에 대한 명명법은 소스가 종에 의해 달라지기 때문에 달라진다. 인간에서 골수(BM) 및 혈연관계가 아닌 제대혈(UCB)이 이식을 위해 사용될 수 있다. 그러나, 조혈모세포의 가장 신속한 소스는 동기 공여자(sibling donor)가 없는 경우, 보관된 제대혈로부터 유래한다. 따라서, 인간에서의 절차는 UCBT라 칭할 수 있다. 마우스에서, 공통 유전자 골수 세포가 이용되고, 그 절차는 종종 BMT라 칭한다.
- [0081] UCBT(또는 BMT)는 성공적인 면역제거 이후, 그러나 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 이전에 수행될 수 있다. 몇몇 예에서, UCBT(또는 BMT)는 적어도 6시간 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 6시간 이전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 12시간 이전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 1일 전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 2일 전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 3일 전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 4일 전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 5일 전, GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 6일 전, 또는 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 적어도 7일 전, 예를 들어 GALC를 코딩하는 핵산 분자를 투여하기 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 또는 96시간 이전에 수행될 수 있다. 몇몇 예에서, UCBT(또는 BMT)는 정맥 내로 투여된다.
- [0082] 몇몇 예에서, UCB(또는 BM)는 대상체에 대해 동종이체이다. 몇몇 예에서, 공여자는 치료하려는 크라베병 대상체에 대한 대립 유전자 레벨 HLA-DRB1 타이핑을 가진 6개의 HLA 일치 중 최소 4개를 보유하는데, 예를 들어 6개의 HLA 마커 중 4, 5 또는 6개와 일치한다.
- [0083] 몇몇 예에서, UBC(또는 BM)는 적어도  $2 \times 10^7$ /kg, 적어도  $3 \times 10^7$ /kg, 예를 들어 적어도  $5 \times 10^7$ /kg, 적어도  $1 \times 10^8$ /kg AIBW, 또는 적어도  $3 \times 10^8$ /kg AIBW의 총 유허 세포(TNC) 용량으로 투여된다. 따라서, 몇몇 예에서, UBC(또는 BM)는 적어도 2천만 TNC/kg, 2천 5백만 TNC/kg, 3천만 TNC/kg, 적어도 5천만 TNC/kg, 적어도 6천만 TNC/kg, 적어도 7천만 TNC/kg, 적어도 8천만 TNC/kg, 적어도 9천만 TNC/kg, 적어도 1억 TNC/kg, 적어도 1억 TNC/kg, 적어도 1억 2천만 TNC/kg, 적어도 2억 TNC/kg, 또는 적어도 2억 5천만 TNC/kg, 예를 들어 5 내지  $12 \times 10^7$  TNC/kg 또는 2.3 내지  $25 \times 10^7$  TNC/kg의 투여를 포함한다..
- [0084] 몇몇 예에서, UBC(또는 BM)는 적어도  $1.5 \times 10^5$ /kg, 예를 들어 적어도  $3 \times 10^5$ /kg, 적어도  $5 \times 10^5$ /kg, 적어도  $1 \times 10^6$ /kg, 적어도  $3 \times 10^6$ /kg, 적어도  $5 \times 10^6$ /kg, 적어도  $1 \times 10^7$ /kg, 적어도  $3 \times 10^7$ /kg, 적어도  $5 \times 10^7$ /kg, 또는 적어도  $1 \times 10^8$ /kg, 예를 들어 1 내지  $9 \times 10^5$  /kg의 CD34+ 전구세포 용량을 포함한다.
- [0085] 또한, 상기 대상체에게는 +1일에 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)가 투여될 수 있고, 및 ANC가  $\geq 2,000$ 이 될 때까지 계속된다. 몇몇 예에서, G-CSF는 매일 정맥 내로 적어도 1 mcg/kg/투여의 용량, 예를 들어 매일 정맥 내 또는 피하로 적어도 5 mcg/kg/투여의 용량, 매일 정맥 내 또는 피하로 적어도 10 mcg/kg/투여의 용량, 또는 매일 정맥내 또는 피하로 적어도 10 mcg/kg/투여의 용량으로 투여된다.
- [0086] GALC 발현 증가
- [0087] 기능적 GALC를 코딩하는 핵산 분자는 공지되어 있고, 본 출원에 특정 예가 제공된다. 몇몇 예에서, 사용된 GALC의 서열은 치료된 대상체와 일치한다. 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, 정상(예를 들어, 크라베병과 관련된 돌연변이를 포함하지 않는 대상체와 같이 돌연변이되지 않은) 인간 GALC 코딩 서열이 사용될 수 있다.
- [0088] 따라서, 몇몇 예에서, 처리된 대상체에서 GALC의 발현은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500% 또는 적어도 600%까지 처리된 대상체의 세포 내에서 GALC 단백질 발현 및/또는 활성을 증가시킨다. 몇몇 예에서, 처리된 대상체에서 GALC의 발현은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500% 또는 적어도 600%까지 상기 대상체에서 GALC 활성(예를 들어, 세라마이드 유도체로부터 갈락토오스의 제거)을 증가시킨다. 예를 들어, GALC 활성의 그러한 증가는 CNS 및/또는 PNS에서, 예를 들어 뇌, 척수, 소뇌, 및/또는 말초 신경(예를 들어, 좌골 신경)에서 관찰될 수 있다. 몇몇 예에

서, 대상체에서 GALC의 발현은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500% 또는 적어도 600%까지 상기 대상체의 CNS 및/또는 PNS에서 미엘린화를 증가시킨다. 몇몇 예에서, 이들 효과의 조합이 달성된다.

[0089] 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 벡터의 일부분이 아니다. 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터, AAV 벡터, 또는 레트로바이러스의 일부분이다. 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열의 발현은 프로모터, 예를 들어 구성적 프로모터에 의해 구동된다. 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 대상체에 정맥 내로 도입된다.

[0090] 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 유전자 편집 방법, 예를 들어 CRISPR/Cas 시스템, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 편집, 전사 활성화-유사 효과인자 기반 뉴클레아제(TALEN) 편집 등을 이용하여 투여된다.

[0091] 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 네이키드 핵산 분자로서 투여된다. 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 벡터(예를 들어, AAVrh.10-hGALC)의 일부분이고, 예를 들어 벡터의 응집을 감소시키고, 및 혈액 뇌 장벽의 투과를 증가시키기 위해 5% 소르비톨과 함께 380 mM PBS 중에서 제형화된다.

[0092] *GALC* 서열

[0093] 사용된 GALC 코딩 서열은 천연 또는 변이체 GALC 서열일 수 있다. 천연 GALC 서열은 몇몇 종에 대해 상기 GenBank® Accession No.에 의해 제공된다. 따라서, 몇몇 예에서, 대상체 내로 도입된 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 그것을 함유하는 벡터)는 천연 GALC 코딩 서열을 포함한다. 몇몇 예에서, 대상체 내로 도입된 GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 그것을 함유하는 벡터)는 비천연 GALC 코딩 서열을 포함하지만, 천연 GALC 단백질 서열(예를 들어, 축퇴성 코딩 서열)을 코딩한다.

[0094] 한 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 그것을 함유하는 벡터)는, 상기 GenBank® Accession No.에 의해 제공되고, 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 단일 삽입, 단일 결실, 단일 치환을 함유할 수 있는 변이체를 포함하는, 변이체 GALC 단백질을 코딩한다. 그러나, 그러한 변이체는 단백질의 기능, 예를 들어 세라마이드 유도체로부터 갈락토오스를 제거할 수 있는 능력에 부정적인 영향을 미치지 않는다(예를 들어, 크라베병과 관련된 돌연변이(들)를 포함한다). 몇몇 예에서, 변이체 GALC 단백질은 1-20개의 삽입, 1-20개의 결실, 1-20개의 치환, 및/또는 이의 임의의 조합(예를 들어, 1-19개의 치환과 함께 단일 삽입)을 포함한다. 몇몇 예에서, 변이체 GALC 단백질은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 아미노산 변화를 보유한다. 몇몇 예에서, 변이체 GALC 단백질은 1-8개의 삽입, 1-15개의 결실, 1-10개의 치환, 및/또는 이의 임의의 조합(예를 들어, 1-15, 1-4, 또는 1-5개의 아미노산 결실과 함께 1-10, 1-5 또는 1-7개의 아미노산 치환)을 포함한다. 한 예에서, 그러한 변이체 펩티드는 표준 절차, 예를 들어 부위-지정 돌연변이 또는 PCR을 이용하는 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드를 조작함으로써 생성된다.

[0095] 변형의 한 유형은 아미노산을 유사한 생화학적 특성을 보유하는 아미노산 잔기로 치환, 즉 보존적 치환(예를 들어, 1-4, 1-8, 1-10, 또는 1-20개의 보존적 치환, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 보존적 치환)을 포함한다. 전형적으로, 보존적 치환은 생성되는 펩티드의 활성에는 영향이 거의 없거나 없다. 예를 들어, 보존적 치환은 단백질의 천연 기능(예를 들어, 세라마이드 유도체로부터 갈락토오스의 제거)에 실질적으로 영향을 미치지 않는, 임의의 천연 GALC 단백질 서열 내의 아미노산 치환이다. 알려진 스캔은 GALC 단백질 내의 어떤 아미노산 잔기가 아미노산 치환을 용인할 수 있는지 확인하기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, GALC의 천연 기능은, 1-4, 1-8, 1-10, 또는 1-20개의 천연 아미노산이 알려진 또는 다른 보존적 아미노산으로 치환되는 경우, 25% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하 또는 5% 이하까지 변경되지 않는다. GALC 단백질 내에서 원래의 아미노산을 치환할 수 있고 및 보존적 치환으로 간주되는 아미노산의 예는 하기를 포함한다: Ala를 Ser로; Arg를 Lys, Gln, 또는 Asn으로; Asn를 Gln 또는 His으로; Asp를 Glu로; Cys를 Ser로; Gln를 Asn으로; Glu를 Asp로; Gly를 Pro로; His를 Asn 또는 Gln으로; Ile를 Leu 또는 Val으로; Leu를 Ile 또는 Val로; Lys를 Arg 또는 Gln으로; Met를 Leu 또는 Ile로; Phe를 Met, Leu 또는 Tyr로; Ser를 Thr로; Tyr를 Ser로; Trp를 Tyr로; Tyr를 Trp 또는 Phe로; 및 Val를 Ile 또는 Leu로.

[0096] 천연 또는 변이체 GALC 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 벡터 내로 통합될 수 있다. 본 출원에 제공된 GenBank® Accession No.에서 나타난 것과 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 것과 같은 천연 또는 변이체 GALC를 코딩하는 핵산 서열이 생성될 수 있다. 또한, 서열이 상이하지만 동일한 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열과 같은 기능적으로 균등한 핵산을

함유하는 여러 가지 클론이 생성될 수 있다. 몇몇 예에서, 그러한 GALC 코딩 서열은 숙주 세포 내에서의 발현을 위해 최적화될 수 있다.

- [0097] 코딩 서열 내의 침묵 돌연변이는 유전 암호의 축퇴(즉, 중복)에 기인하는데, 이로 인해 하나 이상의 코돈은 동일한 아미노산 잔기를 코딩할 수 있다. 따라서, 예를 들어 루신은 CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, 또는 TTG에 의해 코딩될 수 있고; 세린은 TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, 또는 AGC에 의해 코딩될 수 있고; 아스파라긴은 AAT 또는 AAC에 의해 코딩될 수 있고; 아스파르트산 GAT 또는 GAC에 의해 코딩될 수 있고; 시스테인은 TGT 또는 TGC에 의해 코딩될 수 있고; 알라닌은 GCT, GCC, GCA, 또는 GCG에 의해 코딩될 수 있고; 글루타민은 CAA 또는 CAG에 의해 코딩될 수 있고; 타이로신은 TAT 또는 TAC에 의해 코딩될 수 있고; 및 이소루신은 ATT, ATC, 또는 ATA에 의해 코딩될 수 있다.
- [0098] 특정 종에 대한 코돈 선호 및 코돈 용법표는 특정 종의 코돈 용법 선호를 이용하는 GALC 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자를 조작하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 박테로부터 발현된 GALC 단백질은 관심있는 특정 유기체(예를 들어, 크라베병을 가진 포유동물)에 의해 우선적으로 사용되는 코돈을 보유하도록 디자인될 수 있다.
- [0099] GALC 단백질을 코딩하는 핵산은 클로닝되고, 시험관 방법, 예를 들어 폴리머라아제 사슬 반응(PCR), 리가아제 사슬 반응(LCR), 전사 기반 증폭 시스템(TAS), 자가-지속 서열 복제 시스템(3SR) 및 Q $\beta$  레플리카아제 증폭 시스템(QB)에 의해 증폭될 수 있다. 다양한 클로닝 및 시험관내 증폭 방법이 사용될 수 있다. 또한, GALC 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 클로닝 기법에 의해 제조될 수 있다. 적합한 클로닝 및 서열 기법의 예, 및 통상의 기술자를 위한 충분한 정보는 문헌[참조: Sambrook *et al.*(ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, N.Y., 1989, and Ausubel *et al.*,(1987) in "*Current Protocols in Molecular Biology*," John Wiley and Sons, New York, N.Y.]에서 확인할 수 있다.
- [0100] GALC 단백질을 코딩하는 핵산 서열은, 예를 들어, 적절한 서열의 클로닝을 포함하는 임의의 적합한 방법, 또는 포스포트리에스테르법(참조: Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979); 포스포다이에스테르법(참조: Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109-151, 1979); 디에틸포스포르아미다이트 트리에스테르법(참조: Beaucage & Caruthers, *Tetra. Letts.* 22(20):1859-1862, 1981), 예를 들어 문헌(참조: Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12:6159-6168, 1984)에 기재된 바와 같은 자동화된 합성기를 이용하는 방법; 및 미국 특허 제4,458,066호의 고품 지지체법과 같은 방법에 의한 직접 화학 합성에 의해 제조될 수 있다. 화학 합성은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 이는 상보적인 서열과의 하이브리드화에 의해, 또는 상기 단일 가닥을 주형으로서 이용하는 DNA 폴리머라아제에 의한 중합에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. 통상의 기술자는, DNA의 화학 합성이 일반적으로 약 100개의 염기의 서열로 제한되는 한편, 더 긴 서열은 더 짧은 서열의 연결에 의해 얻을 수 있음을 인지할 것이다.
- [0101] 한 예에서, GALC 단백질은 GALC 단백질을 코딩하는 cDNA를 박테에 삽입함으로써 제조된다. 삽입은 단백질(들)이 프레임 내에서 관독되어 단백질(들)이 생성되도록 할 수 있다. GALC 단백질을 코딩하는 이중 핵산 서열을 함유하는 제조용 박테(예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스)를 제조하는 기법은 공지되어 있다.
- [0102] GALC 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 발현 박테 내로 삽입될 수 있는데, 발현 박테의 예로는 플라스미드, 바이러스 또는 서열의 삽입 또는 통합이 가능하고, 크라베병 환자에서 발현될 수 있도록 조작될 수 있는 다른 비히클을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 박테로부터 코딩 서열을 발현시키는 방법은 공지되어 있다. T 세포 내에서 복제 및 발현할 수 있는 생물학적으로 기능성인 바이러스 및 플라스미드 DNA 박테는 공지되어 있다. 발현 박테는, T 세포 내에서 GALC 단백질 코딩 서열을 함유하는 발현 박테의 전달 및 후속 복제를 위해 필요한 추가의 요소를 함유할 수 있다. 그러한 요소의 예로는 복제 원점 및 선택 가능한 마커, 예를 들어 티미딘 키나아제 유전자 또는 항생제 내성 마커를 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0103] GALC 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 발현 조절 서열, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 조절 서열은 GALC 단백질 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되어, 상기 발현 조절 서열과 양립하는 조건 하에서 GALC 단백질 코딩 서열의 발현을 달성하게 한다. 예시적인 발현 조절 서열은 적합한 프로모터, 인핸서, 전사 종결자, GALC 단백질-코딩 유전자 앞의 출발 코돈(즉, ATG), 인트론을 위한 스플라이싱 신호, mRNA의 적합한 번역을 허용하는 상기 유전자의 정확한 리딩 프레임의 유지, 및 종결 코돈을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 발현 조절 서열의 예는 lac 프로모터, 오퍼레이터 및 파지 람다의 프로모터 영역, 및 폴리오마, 아데노바이러스, 레트로바이러스 또는 SV40으로부터 유래하는 프로모터를 포함하나, 이들로 제한되는

것은 아니다. 추가의 작동 요소는 리더 서열, 종결 코돈, 폴리아데닐화 신호 및 숙주 세포 내에서 GALC 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 적절한 전사 및 후속 번역을 위해 필요한 다른 서열을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 한 예에서, 프로모터는 인간 CMV 인핸서, 베타-작용 프로모터, 베타-글로빈 스플라이스 억셉터, 또는 이의 조합(예를 들어, 참조 도 1, CAG 프로모터)을 포함한다. 몇몇 예에서, 2개 또는 3개의 프로모터가 사용된다.

[0104] 예시적인 바이러스 벡터

[0105] GALC 단백질을 코딩하는 바이러스 벡터가 제조될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 바이러스 벡터는 조류, 쥐 과동물, 및 인간 기원의 폴리오마, SV40, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), HSV 및 EBV를 포함하는 헤르페스 바이러스, 신드비스 바이러스, 알파바이러스 및 레트로바이러스를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 바쿨로바이러스(아우토그라파 칼리포니카 다핵성 다각체병 바이러스; AcMNPV) 벡터도 사용될 수 있다. 다른 적합한 벡터는 진성두창 바이러스, 조류폭스 바이러스, 계두 바이러스 벡터, 염소 두종 바이러스 벡터, 수이폭스 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 알파 바이러스 벡터, 및 폴리오바이러스 벡터를 포함한다. 특정의 예시적인 벡터는 폭스바이러스, 예를 들어 백시니아 바이러스, 계두 바이러스 및 고도로 감쇠된 백시니아 바이러스(MVA), 아데노바이러스, 바쿨로바이러스 등이다. 사용되는 폭스바이러스는 진성두창 바이러스, 수이폭스 바이러스, 조류폭스 바이러스, 및 염소두종 바이러스를 포함한다. 진성두창은 백시니아, 사지부전증, 및 미국너구리 폭스를 포함한다. 사용되는 진성두창의 한 예는 백시니아이다. 조류폭스는 계두, 카나리아 두창 및 구두를 포함한다. 염소두종은 산양 두창 및 양두를 포함한다. 한 예에서, 수이폭스는 돈두이다. 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터는 다른 DNA 바이러스, 예를 들어 헤르페스 바이러스 및 아데노바이러스, 및 RNA 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스 및 폴리오바이러스를 포함한다.

[0106] 몇몇 예에서, GALC 코딩 서열은 벡터의 일부분, 예를 들어 정맥 내 투여 후, 예를 들어 혈액 뇌 장벽을 투과할 수 있는 것이다. 그러한 벡터의 예는 아데노 연관 바이러스(AAV), 예를 들어 AAV 혈청형 AAV9 및 AAVrh.10을 포함한다. 아데노 연관 바이러스 혈청형 rh.10(AAV.rh10) 벡터는 부분적으로 혈액 뇌 장벽을 투과하고, 높은 레벨과 범위의 트랜스유전자 발현을 제공하고(Sondhi *et al.*, *Mol Ther.* 15(3):481-91, 2007; De *et al.*, *Mol Ther.* 13:67-76, 2006), 및 정맥내 전달 후 뉴런, 성상세포, 및 신경교세포를 변환하는 것으로 보인다(Zhang *et al.*, *J. Virol. Methods* 179:276-80, 2011).

[0107] 본 출원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 예시적인 AAV.rh10 캡시드의 서열은 서열번호 3에 제공된다(다른 예는 EP 2341068의 서열번호 59에 제공된다). 따라서, 몇몇 예에서, 사용된 AAV.rh10 벡터는 서열번호 3에 대해 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하거나, 또는 서열번호 4에 대해 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 단백질을 코딩하는 핵산을 포함한다. AAV.rh10은 AAV2 유전자 전달 벡터 골격(발현 카세트에 인접하는 AAV2의 역전된 말단 반복부); 인간 사이토메갈로바이러스 인핸서를 가진 발현 카세트; 프로모터, 스플라이스 도너, 및 병아리 β-액틴 유래의 좌측 인트론 서열; 우측 인트론 서열 및 래빗 β-글로빈 유래의 스플라이스 억셉터(이 인핸서/프로모터/인트론 서열은 "CAG"라 언급됨)를 포함한다. 이 CAG 프로모터는 AAV 벡터 내에서 유전자 발현을 구동하기 위해 사용된 강한 편재성 프로모터이다. AAV.rh10-h GALC 벡터는 전장 인간 GALC cDNA; 및 래빗 β-글로빈 폴리A 서열을 추가로 포함한다(도 1). 단일 가닥 게놈은 레서스 원숭이로부터 최초로 단리된 AAV 혈청형 rh.10의 캡시드 내에 패키징될 것이다(Gao *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(18):11854-9, 2002). 당해 기술분야의 통상의 기술자는, 전장 인간 GALC cDNA는 치료하려는 대상체에 따라 관심있는 임의의 포유동물 유래의 GALC cDNA로 대체될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 예를 들어 크라베병에 대해 치료하려는 개는 전장 인간 GALC cDNA 대신에 전장 개 GALC cDNA를 포함하는 AAV.rh10-GALC 벡터를 이용할 수 있다. 벡터 명칭에서 유전자 약어 앞의 소문자는 트랜스유전자의 소스인 종을 나타내기 위해 사용될 수 있는데, 예를 들어 AAVrh.10-mGALC = 마우스 cDNA이고, 및 AAVrh.10-hGALC = 인간 cDNA이다.

[0108] 벡터의 일부분일 수 있는 예시적인 AAV.rh10 캡시드 서열의 서열번호 3에 제공된다. 따라서, 몇몇 예에서, 사용된 AAV.rh10는 서열번호 3에 대해 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 보유한다. 몇몇 예에서, 사용된 AAV.rh10은 서열번호 4에 대해 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 보유하는 단백질을 코딩한다.

[0109] 몇몇 예에서, 벡터(예를 들어, AAVrh.10-hGALC)는, 예를 들어 벡터의 응집을 감소시키고, 및 혈액 뇌 장벽의 투

과를 증강시키기 위해 5% 소르비톨과 함께 380 mM PBS 중에서 제형화된다.

[0110] 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는 예를 들어 대상체당 적어도  $1 \times 10^{11}$  게놈 카피(gc, 종종 벡터 게놈(vg)이라 칭함), 예를 들어 대상체당 적어도  $2 \times 10^{11}$  gc,  $1 \times 10^{12}$  gc, 적어도  $2 \times 10^{12}$  gc, 적어도  $1 \times 10^{13}$  gc, 적어도  $2 \times 10^{13}$  gc, 또는 대상체당 적어도  $1 \times 10^{14}$  gc, 예를 들어 대상체당  $2 \times 10^{11}$  gc, 대상체당  $2 \times 10^{12}$  gc, 대상체당  $2 \times 10^{13}$  gc, 또는 대상체당  $2 \times 10^{14}$  gc의 용량으로 정맥내 투여된다. 몇몇 예에서, GALC를 코딩하는 핵산 분자는, 예를 들어 대상체당 적어도  $1 \times 10^{11}$  gc/kg, 적어도  $5 \times 10^{11}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{12}$  gc/kg, 적어도  $5 \times 10^{12}$  gc/kg, 적어도  $1 \times 10^{13}$  gc/kg, 적어도  $5 \times 10^{13}$  gc/kg, 또는 적어도  $a \times 10^{14}$  gc/kg, 예를 들어  $4 \times 10^{11}$  gc/kg,  $4 \times 10^{12}$  gc/kg, 또는  $4 \times 10^{13}$  gc/kg의 용량으로 정맥내 투여된다.

[0111] 부정적인 증상, 예를 들어 혈액 내의 AAV-캡시드 특이적인 T 세포가 발생하는 경우, 코르티코스테로이드가 투여될 수 있다(참조: 예를 들어, Nathwani *et al.*, *N Engl J Med.* 365(25):2357-65, 2011).

[0112] **유전자 치료 이전의 면역제거 및 이식**

[0113] 본 출원에서, 유전자 돌연변이(예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 삽입 또는 치환, 또는 이의 조합)로부터 야기되는 질병을 가진 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 개시된 방법은 유전자 치료에 사용된 제제(예를 들어, 바이러스 벡터 또는 이의 부분, 또는 대상체에 의해 이전에 발현되지 않은 단백질)에 대한 면역 반응(예를 들어, 항체 발생)을 감소시키거나 또는 방지한다. 그러한 방법은 유전자 치료의 성공을 증가시킬 수 있다. 개시된 방법은 환자의 골수를 제거하는 단계; 조혈모세포(HSC)(면역계를 이용하여 대상체를 재구성할 것임)로 환자를 이식하는 단계, 및 HSC 이식 후 유전자 치료를 시행하는 단계를 포함한다.

[0114] 하나의 실시양태에서, 면역제거제(들), HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 치료적 핵산 분자를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 환자의 생존 시간을 증가시키기에, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 또는 적어도 600%(면역제거제(들), HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다. 하나의 실시양태에서, 면역제거제(들), HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 치료적 핵산 분자를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 환자의 생존 시간을 증가시키기에, 예를 들어 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년, 적어도 1.5년, 적어도 2년, 적어도 2.5년, 적어도 3년, 적어도 4년, 적어도 5년, 적어도 10년, 적어도 12년, 적어도 15년, 또는 적어도 20년(면역제거제(들), HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 증가시키기에 충분한 양이다.

[0115] 몇몇 예에서, HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자(예를 들어, 치료적 핵산 분자를 코딩하는 벡터)의 "유효량"은 치료된 환자에서 유전자 치료에 대한 면역 반응을 감소시키기에, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 적어도 100%(면역제거제(들), HSC, 및 치료적 핵산 분자를 코딩하는 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)까지 감소시키기에 충분한 양이다. 몇몇 예에서, 유전자 치료에 대한 면역 반응의 감소는 치료적 단백질, 벡터 성분, 또는 둘 다에 대한 항체 생성을 모니터링함으로써 측정된다.

[0116] 따라서, 개시된 방법은 치료된 환자의 생존 시간을 증가시키거나, 유전자 치료에 대한 면역 반응을 감소시키거나, 또는 둘 다 가능하다.

[0117] **대상체**

[0118] 치료하려는 대상체는 임의의 척추동물, 예를 들어 새 또는 포유동물일 수 있는데, 이들은 임의의 유전병, 예를 들어 표 1에 목록화된 질병을 보유한다. 따라서, 유전병을 가진 인간, 원숭이, 고양이, 개 또는 다른 척추동물 대상체가 개시된 방법으로 치료될 수 있다. 몇몇 예에서, 상기 대상체는 6개월 미만의 인간 유아이다. 몇몇 예에서, 상기 대상체는 적어도 18세의 인간 성인이다.

[0119] **전부 또는 일부 골수제거**

[0120] 몇몇 예에서, 골수 이식(예를 들어, HSC를 이용) 및 유전자 치료를 받기 이전에, 대상체는 골수 내의 조혈 세포를 근절하는 양의 골수제거 요법을 받는다. 그러한 방법은 대상체의 면역계를 억제하고, 그들의 골수를 파괴한다. 이 치료는 투여 후 1 내지 3주 내에 심한 범혈구감소증을 초래한다. 그러한 치료는 후속적으로 시행되는 유

전자 치료에 대한 면역 반응을 감소 또는 제거하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 예에서, 대상체를 골수제거하기 위해 화학요법, 방사선요법, 또는 둘 다 사용된다.

- [0121] 몇몇 예에서, 대상체에게 치료 유효량의 전신 조사(TBI), 화학요법, 또는 이의 조합이 시행된다. 사용될 수 있는 화학치료제의 예로는 카르무스틴, 부설판(Bu), 카르보플라틴, 시클로포스파미드(Cy), 시톡산, 에토포시드, 플루다라빈, 히드록시우레아, 멜팔란, 메토크세이트, 티오테파, 및 토포테칸을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 한 예에서, 대상체는 치료 유효량의 부설판으로 치료된다. 한 예에서, 대상체는 치료 유효량의 알렘투주맙, 히드록시우레아, 플루다라빈, 및 부설판으로 치료된다. 한 예에서, 대상체는 치료 유효량의 알렘투주맙 및 플루다라빈(예를 들어, 0.2 내지 5 mg/kg iv 알렘투주맙, 0.1 내지 30 mg/kg iv 플루다라빈)으로 치료되는데, 몇몇 예에서, 히드록시우레아(예를 들어, 30 mg/kg/일 경구), Bu, 멜팔란(예를 들어, 70 mg/kg/투여 IV), 티오테파(예를 들어, 200 mg/kg/투여 IV) 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 치료 유효량의 타크롤리무스 및 미코페놀레이트 모페틸(MMF)의 투여를 추가로 포함한다.
- [0122] 몇몇 예에서, 치료하려는 대상체는 조사되는데, 예를 들어 3~일에 걸쳐서 1200 내지 1300 센티그레이가 조사된다. 한 예에서, 대상체에게 16의 총 용량(16 mg/kg)으로 6시간 마다 1 mg/kg의 Bu가 경구 투여되고, 이어서 2~일 후 Cy 총 120-200 mg/kg이 투여된다. 몇몇 예에서, 대상체에게 200 cGy의 6회 분할 조사량과 함께 120 mg/kg Cy가 투여된다.
- [0123] 성공적인 골수제거는 전적으로 숙주 T 세포 회복의 부재이다. 즉, T 세포 키메리즘이 100% 숙주가 아닌 한, 골수제거는 성공적이다. 몇몇 경우에서, 일부 숙주 T 세포는 ~0%로 관찰되지만, 이는 시간 경과에 따라 감소한다.
- [0124] 몇몇 예에서, 골수 이식(예를 들어, HSC를 이용) 및 유전자 치료를 받기 이전에, 대상체는 골수 내의 조혈 세포를 감소시키지만, 전부 제거하지 않는 양으로 비골수제거 요법을 받는다. 따라서, 그러한 대상체는 수용자 골수를 일부 제거하지만 전부 제거하지 않는 것으로 예상되는 감소된 용량의 화학요법 또는 전신조사를 받을 수 있다. 한 예에서, 비골수제거 치료는 부설판을 이용하지 않으나, 대신에 멜팔란 및 티오테파(예를 들어, 본 출원에 전적으로 참고로 인용되는 NIH 임상 시험 NCT01962415([clinicaltrials.gov/show/NCT01962415](http://clinicaltrials.gov/show/NCT01962415))에 기재된 바와 같음)를 이용한다. 몇몇 예에서, 멜팔란은 70 mg/m<sup>2</sup>/투여로 정맥 내 투여되고, 및 티오테파는 200 mg/m<sup>2</sup>/투여로 정맥내 투여된다.
- [0125] HSC의 주입
- [0126] 대상체가 골수제거 요법을 받을 후, 상기 대상체에게는 골수를 재생하는 세포, 예를 들어 HSC(예를 들어, 동종 이계 HSC)가 투여된다. 그러한 방법은 골수제거 요법 이후에 대상체의 면역계를 재생시킨다. HSC는 모든 혈액 세포를 생성하는 줄기세포이다. 따라서, HSC는 생체 내에서 모든 혈액 계통을 생성할 수 있다. 그들은 제대혈, 혈액, 및 골수(BM)에 존재한다. 몇몇 예에서, HSC는 CD34를 발현한다. 몇몇 예에서, 마우스 HSC는 CD34lo/-, SCA-1+, Flt-3+, C-키트+, lin-이다. 몇몇 예에서, 인간 HSC는 CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, CD38lo/-, C-키트/CD117+, CD166+, lin-이다.
- [0127] 몇몇 예에서, 대상체에게는 골수(BM), 혈연관계가 아닌 제대혈, 보관된 제대혈, 또는 HSC(예를 들어, 혈액(예를 들어, PBMC) 또는 BM)로부터 얻은 것) 제대혈, 혈액, 또는 BM)가 투여된다. 이식은 성공적인 미엘린화 이후, 그러나 유전자 치료를 위한 핵산 분자의 투여 이전에 수행된다.
- [0128] 몇몇 예에서, HSC를 포함하는 이식은 유전자 치료를 위한 핵산 분자를 투여하기 적어도 6시간 이전, 유전자 치료를 위한 핵산 분자를 투여하기 적어도 12시간 이전, 예를 들어 유전자 치료를 위한 핵산 분자를 투여하기 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 또는 적어도 2개월 이전, 예를 들어 유전자 치료를 위한 핵산 분자를 투여하기 적어도 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 또는 96시간 이전에 시행된다.
- [0129] 몇몇 예에서, HSC는 대상체에 대해 동종이계이다. 몇몇 예에서, 공여자는 치료하려는 대상체에 대한 대립유전자 레벨 HLA-DRB1 타이핑과의 6개의 HLA 매치 중 최소 4개, 예를 들어 6개의 HLA 마커 중 4, 5 또는 6개와 일치한다. 몇몇 예에서, HSC는 대상체에 대해 자가 유래이다.
- [0130] 몇몇 예에서, 대상체는 적어도 2 × 10<sup>7</sup>/kg, 적어도 3 × 10<sup>7</sup>/kg, 예를 들어 적어도 5 × 10<sup>7</sup>/kg, 적어도 1 × 10<sup>8</sup>/kg AIBW, 또는 적어도 3 × 10<sup>8</sup>/kg AIBW의 총 유효 세포(TNC) 용량을 받는다. 따라서, 몇몇 예에서, 대상체에게 적어도 2천만 TNC/kg, 2천 5백만 TNC/kg, 3천만 TNC/kg, 적어도 5천만 TNC/kg, 적어도 6천만 TNC/kg, 적

어도 7천만 TNC/kg, 적어도 8천만 TNC/kg, 적어도 9천만 TNC/kg, 적어도 1억 TNC/kg, 적어도 1억 TNC/kg, 적어도 1억 2천만 TNC/kg, 적어도 2억 TNC/kg, 또는 적어도 2억 5천만 TNC/kg, 예를 들어 5 내지  $12 \times 10^7$  TNC/kg 또는 2.3 내지  $25 \times 10^7$  TNC/kg이 투여된다.

[0131] 몇몇 예에서, 대상체는 적어도  $1.5 \times 10^5$ /kg, 예를 들어 적어도  $3 \times 10^5$ /kg, 적어도  $5 \times 10^5$ /kg, 적어도  $1 \times 10^6$ /kg, 적어도  $3 \times 10^6$ /kg, 적어도  $5 \times 10^6$ /kg, 적어도  $1 \times 10^7$ /kg, 적어도  $3 \times 10^7$ /kg, 적어도  $5 \times 10^7$ /kg, 또는 적어도  $1 \times 10^8$ /kg, 예를 들어 1 내지  $30 \times 10^5$ /kg, 예를 들어 1.5 내지  $30 \times 10^5$ /kg의 CD34+ 전구세포 용량이 투여된다.

[0132] 또한, 상기 대상체에게는 +1일에 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)를 투여하고, ANC가  $\geq 2,000$ 일 때까지 투여를 계속할 수 있다. 몇몇 예에서, G-CSF는 적어도 1 mcg/kg/투여 매일 IV 또는 SC, 예를 들어 적어도 5 mcg/kg/투여 매일 IV 또는 SC, 적어도 10 mcg/kg/투여 매일 IV 또는 SC, 또는 적어도 10 mcg/kg/투여 매일 IV 또는 SC의 용량으로 투여된다.

[0133] 몇몇 예에서, 이식 후, 대상체는, 그들의 면역계가 회복될 때까지, 면역억제 요법을 받는다. 몇몇 예에서, 대상체에게는 치료 유효량의 하나 이상의 면역억제제, 예를 들어 칼시뉴린 억제제(예를 들어, 타크롤리무스, 시클로스포린 A), 글루코코르티코이드(예를 들어, 프레드니손, 텍사메타손, 히드로코티손) 또는 세포정지제(예를 들어, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 세포독성 항생제)가 투여된다. 몇몇 예에서, 대상체에게는 이식 후 치료 유효량의 시클로포스팜나이드가 투여된다.

[0134] 유전자 치료의 시행

[0135] 면역계 및 관련된 전부 또는 일부 골수 제거 후, 치료된 대상체의 조혈 및 면역계를 재건하기 위해 HSC(예를 들어, 제대혈 또는 골수)가 이식되고, 치료 유효량의 치료적 핵산 분자가 대상체에게 투여되는데, 이때 상기 핵산 분자는 유전병을 교정한다. 몇몇 예에서, 상기 치료적 핵산 분자는 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV 벡터(예를 들어, AAV.rh10), 아데노바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터의 일부분이다. 다른 예는 본 출원에 제공된다(또한, 참조: Choudhury *et al.*, *Neuropharmacol.* 120:63-80, 2017, 본 출원에 전적으로 참고로 인용됨). 상기 방법은 특정 유전자 치료로 제한되지 않으며, 비상동성 말단 연결(NHEJ), 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화-유사 효과인자 기반 뉴클레아제(TALEN), 및 CRISPR/Cas9을 이용하는 방법을 포함한다(참조: 예를 들어, Morgan *et al.*, *Cell Stem Cell* 21:574-90, 2017; Shim *et al.*, *Acta Pharma. Sinica* 38:738-53, 2017, 본 출원에 전적으로 참고로 인용됨).

[0136] 유전자 치료의 예는 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키거나, 유전자 또는 단백질의 발현을 감소시키거나, 또는 유전자 또는 단백질 서열을 교정하기 위해 사용된 방법 및 체제를 포함한다. 예를 들어, 유전자 발현을 감소시키기 위해, 기능적 유전자가 대상체, 예를 들어 정상적인 기능이 결핍된 타겟 세포 또는 조직에 전달될 수 있다. 유전자 발현을 감소시키기 위해, 짧은 핵산 분자(예를 들어, siRNA, 안티센스 분자)가 도입되어 질병 관련 유전자를 침묵시키거나 간섭할 수 있다. 유전자 편집 방법은 게놈 레벨에서 영구적이고 특이적인 교정 효과를 발휘하기 위해 사용될 수 있다.

[0137] 개시된 방법을 이용하여 치료될 수 있는 질병은 임의의 혈액 유전병(예를 들어, 겸상 적혈구 질병, 원발성 면역부전 질병), HIV(예를 들어, HIV-1), 및 혈액 악성종양 또는 암을 포함한다. 원발성 면역부전 질병 및 그들의 상응하는 돌연변이의 예는 문헌(참조: Al-Herz *et al.*, *Frontiers in Immunology*, volume 5, article 162, April 22, 2014, 본 출원에 전적으로 참고로 인용됨)에 목록화된 것들을 포함한다. 혈액 악성종양 또는 암은 혈액, 골수, 및 림프절에 영향을 미치는 종양이다. 예로는 백혈병(예를 들어, 급성 림프아구 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 단핵구 백혈병), 림프종(예를 들어, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종), 및 흑색종을 들 수 있다. 표 1은 치료적 핵산 분자에 의해 타겟팅될 수 있는 예시적인 질환 및 유전자의 목록을 제공한다. 몇몇 예에서, 유전자 편집에 의해 교정될 수 있는 돌연변이가 제공된다.

[0138] [표 1] 예시적인 질병 및 대응하는 돌연변이

질병	유전자	돌연변이
혈액 세포 질환		
겸상 적혈구 빈혈	헤모글로빈의 β-글로빈 사슬	점 돌연변이를 일으키는 SNP(A 가 T 로) (Glu→Val 6 번째 아미노산)
혈우병	응고 인자 I 내지 XIII 중 임의의 것	
혈우병 A	응고 인자 VIII	대형 결실, 삽입, 전위, 및 점 돌연변이
혈우병 B	응고 인자 IX	
알파-탈라세미아	HBA1 또는 HBA2	염색체 16 p 내의 결실 또는 돌연변이
베타-탈라세미아	HBB	염색체 11 내의 돌연변이
델타-탈라세미아	HBD	돌연변이
폰 빌레브란트병	폰 빌레브란트 인자 or	돌연변이 또는 결실
악성 빈혈	MTHFR	
판코니 빈혈	FANCA, FANCC, FANCD2, FANCG, FANCI	FANCA: c.3788_3790del(p.Phe1263del); c.1115_1118delTTGG(p.Val372fs); Exon 12-17del; 엑손 12-31del; c.295C>T(p.Gln99X)  FANCC: c.711+4A>T(또는 원래 IVS4+4A>T 로서 보고됨); c.67delG(또는 원래 322delG 로서 보고됨)  FANCD2: c.1948-16T>G  FANCG; c.313G>T(p.Glu105X); c.1077-2A>G; c.1480+1G>C; c.307+1G>C; c.1794_1803del (p.Trp599fs); c.637_643del (p.Tyr213fs)  FANCI: c.2392C>T(p.Arg798X)
혈소판 감소성 자반증	ADAMTS13	미스센스 및 넌센스 돌연변이

[0139]

혈전성향증	인자 V 라이덴 프로트롬빈	위치 1691 에서 F5 유전자 내의 돌연변이 프로트롬빈 G20210A
<b>원발성 면역부전 질병</b>		
T-B+ SCID	IL-2, -4, -7, -9, -15 및 -21 을 위한 수용체의 감마 사슬 내의 IL-2RG, JAK3, 결함	
T-B- SCID	RAG1, RAG2	
WHIM 증후군	CXCR4	이형접합 돌연변이(예를 들어, 카르복시 말단 내의); 카르복시 말단 절단(예를 들어, 10-19 잔기)
<b>다른 원발성 면역 부전 (PID) 증후군</b>		
IL-7 수용체 중증 복합성 면역부전증(SCID)	IL7 수용체	
아데노신 데아미나아제 부전성(ADA) SCID	ADA	
퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라아제(PNP) 부전증	PNP	
위스코트-알드리치 증후군 (WAS)	WAS	확인된 300 개 초과 돌연변이
만성 육아종병(CGD)	CYBA, CYBB, NCF1, NCF2, 또는 NCF4	
백혈구 부착 결핍증(LAD)	베타-2 인테그린	
HIV	C-C 케모카인 수용체 유형 5(CCR5), MSRB1 HIV 긴 말단 반복부 CSCR4 P17 PSIP1	CCR5 내의 32 bp 의 결실
듀켄씨 근이영양증	CCR5 DMD	
IA 형 당원병	G6Pase	
망막 이영양증	CEP290 ABCA4	C2991+1655A>G 5196+1216C>A; 5196+1056A>G; 5196+1159G>A; 5196+1137G>A; 938-619A>G; 4539+2064C>T

[0140]

마그네슘 결핍을 동반하는 X-연관 면역부전, 엡스타인 바르 바이러스 감염, 및 종양 형성(XMEN)	MAGT1	
단일기원 질환		
이염백색질장애(MLD)	아릴설파타아제 A (ARSA)	
부신백질이영양증(ALD)	ABCD1	
무코폴리사카라이드(MPS)질환 헌터 증후군 후롤러 증후군 세이에증후군 산필립포 증후군 A, B, C, 및 D 모르퀴오 증후군 A, 모르퀴오 증후군 B 마로토-라미 증후군 슬라이 증후군 나토위츠(Natowicz) 증후군	IDS IDUA IDUA  SGSH, NAGLU, HGSNAT, GNS GALNS GLB1 ARSB  GUSB HYAL1	
알파 만노사이드축적증	MAN2B1	
A, B, 및 C 형 니만픽 병	SMPD1, NPC1, NPC2	
낭포성 섬유증	낭포성 섬유증 경막 전도 조절자(CFTR)	ΔF508
다낭성 신장 질환	PKD-1, PDK-2, PDK-3	
태이새크스병	HEXA	1278insTATC
고세병	GBA	
헌팅턴병	HTT	CAG 반복부
1 및 2 형 신경섬유종증	NF-1 및 NF2	NF1 내의 CGA→UGA→Arg1306Term
가족성 고콜레스테롤혈증	APOB, LDLR, LDLRAP1, 및 PCSK9	
암		
만성 골수성 백혈병(CML)	BCR-ABL ASXL1	융합
급성 골수성 백혈병(AML)	염색체 11q23 또는 t(9;11)	전위
골육종	RUNX2	
결장암	EPHA1	
위암, 흑색종	PD-1	
전립선암	안드로겐 수용체	

[0141]

자궁경부암	E6, E7	
교아증	CD	
<b>신경학적 질환</b>		
알츠하이머병	NGF	
이염성 대뇌백질위축증	ARSA	
다발성 경화증	MBP	
위스코트-알드리치 증후군	WASP	
X-연관 부신백질이영양증	ABCD1	
AACD 결핍증	AADC	
바텐병	CLN2	
카나반병	ASPA	
거대 축삭 신경병증	GAN	
레버의 유전성 시각 신경병증	MT-ND4	
MPS IIIA	SGSH, SUMF1	
파킨슨병	GAD, NTRN, TH, AADC, CH1, GDNF, AADC	
폼페병	GAA	
1형 척수근 위축증	SMN	

[0142]

[0143]

본 출원에 개시된 방법은 표 1에 목록화된 임의의 질환 또는 다른 공지된 유전 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 치료는 질환의 모든 특성을 100% 제거할 필요는 없지만, 그렇게 감소시킬 수 있다. 이러한 교시에 기초하여 특정 예가 하기에 제공되더라도 불구하고, 다른 질환의 증상이 유사하게 영향받을 것임을 이해할 것이다. 예를 들어, 본 출원에 개시된 방법은 대상체에 의해 발현되지 않거나 또는 대상체에 의해 발현이 감소된 단백질의 발현을 증가시키기 위해, 대상체에 의해 바람직하지 않게 발현되거나 또는 발현이 감소된 단백질의 발현을 감소시키거나, 유전적 돌연변이를 교정하거나, 또는 이들의 조합을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0144]

예를 들어, 개시된 발명은 혈액의 유전병, 예를 들어 일차 면역결핍증의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

[0145]

예를 들어, 개시된 방법(헤모글로빈의  $\beta$ -글로빈 사슬 내의 돌연변이를 교정하는 치료적 핵산 서열을 사용할 수 있는)은 겸상 적혈구병의 바람직하지 않은 효과를 치료하거나, 또는 감소시킬 수 있다. 한 예에서, 치료적 핵산 분자는 겸상 적혈구병을 초래하는 헤모글로빈의  $\beta$ -글로빈 사슬 내의 돌연변이를 교정할 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 겸상 적혈구병의 증상(예를 들어, 혈액 내의 겸상 적혈구의 존재, 동통, 빈혈, 괴사, 빈혈증, 혈관 폐색 위기, 골수무형성 위기, 지라의 격리 위기, 및 용혈성 위기 중 하나 이상)을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 겸상 적혈구의 수를 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다.

[0146]

예를 들어, 개시된 방법(인자 V 라이덴 또는 프로트롬빈 유전자 내의 돌연변이를 교정하는 치료적 핵산 분자를 사용할 수 있는)은 혈전성향증의 바람직하지 않은 영향을 치료 또는 감소시킬 수 있다. 한 예에서, 치료적 핵산 분자는 혈전성향증으로 귀착되는 인자 V 라이덴 또는 트롬빈 유전자 내의 돌연변이를 교정할 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 혈전성향증의 증상(예를 들어, 심부 정맥 혈전증, 폐색전, 정맥혈전색전증, 팽윤, 흉통, 심계항진 중 하나 이상)을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체에서 응고 인자의 활성을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다.

[0147]

예를 들어, 개시된 방법(CD40 리간드 유전자 내의 돌연변이를 교정하는 치료적 핵산 분자를 이용할 수 있는)은 CD40 리간드 결핍의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키는데 사용될 수 있다. 한 예에서, 상기 치료적 핵산 분자는 CD40 리간드 결핍을 초래하는 CD40 리간드 유전자 내의 돌연변이를 교정할 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체에서 CD40 리간드 결핍의 증상(예를 들어, 증가된 혈청 IgM, 다른 면역글로불린의 낮은 혈청 레벨, 기회성 감염, 자가면역 및 악성 종양 중 하나 이상)을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체에서 CD40 리간드 결핍의 양 또는 활성을 증가시키는데, 예를 들어

적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200% 또는 적어도 500%(치료제 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 증가시킨다.

[0148] 예를 들어, 개시된 방법(CCR5 활성을 감소시키는 치료적 핵산 분자를 이용할 수 있는)은 HIV-1 감염의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키는데 사용될 수 있다. 한 예에서, 치료적 핵산 분자는 CCR5 활성, 예를 들어 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70% 또는 적어도 90% 감소시킬 수 있다. 한 예에서, CCR5는 32-bp 결실(CCR5 Δ32)을 포함하도록 개질된다. 한 예에서, CCR5는 32-bp 결실(CCR5 Δ32)을 포함한다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체에서 HIV-1 감염의 증상(예를 들어, 발열, 크고 부드러운 림프절, 목 염증, 홍조, 두통, 입의 신맛, 욕지기, 구토, 설사, 말초신경병증, 지베렐린 증후군, 체중 상실, 바이러스 로드, 감소된 레벨의 CD4+ T 세포, 신경병증, 뉴모시스티스 폐렴, 악액질 중 하나 이상)을 감소시키는데, 예를 들어, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 감소시킨다. 한 구체예에서, 개시된 방법은 HIV-감염된 수용자 대상체에서 CD4+ T 세포를 증가시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500% 또는 적어도 1000%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교)의 CD4+ T 세포를 증가시킨다.

[0149] 예를 들어, 개시된 방법은 유전적 결함에 기인하는 원발성 면역부전 질병의 바람직하지 않은 효과를 치료하거나 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 개시된 방법(상기 목록화된 유전자 내에서 돌연변이를 교정하기 위해 치료적 핵산 분자를 이용할 수 있거나, 또는 대상체 내에서 상실되거나 또는 결함이 있는 기능적 단백질 발현시킬 수 있음)은 원발성 면역부전 질병의 바람직하지 않은 효과를 치료하거나 또는 감소시킬 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 원발성 면역부전 질병의 증상(예를 들어, 박테리아 감염, 진균류 감염, 바이러스 감염, 기생충 감염, 림프샘 팽윤, 비장 비대, 상처 및 체중 손실 중 하나 이상)을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 방법은 원발성 면역부전 질병을 앓고 있는 수용자 대상체 내에서 면역 세포(예를 들어, CD8 세포와 같은 T 세포)의 수를 증가시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 또는 적어도 500%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 증가시킨다. 한 예에서, 개시된 방법은 원발성 면역부전 질병을 앓고 있는 수용자 대상체 내에서 일정 기간에 걸쳐(예를 들어, 1년에 걸쳐) 감염(예를 들어, 박테리아, 바이러스, 균류, 또는 이의 조합)의 수를 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 감소시킨다.

[0150] 예를 들어, 개시된 방법은 단일기원의 질환의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 개시된 방법(상기 목록화된 유전자 내에서 돌연변이를 교정하기 위해 치료적 핵산 분자를 이용할 수 있거나, 또는 대상체 내에서 상실되거나 또는 결함이 있는 기능적 단백질을 발현시킬 수 있음)은 단일기원의 질환의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체 내에서 단일기원의 질환의 증상을 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 또는 적어도 500%(치료적 핵산 분자를 투여하지 않는 경우와 비교) 감소시킨다.

[0151] 예를 들어, 개시된 방법은 수용자 대상체 내에서 혈액성 악성 종양의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체(예를 들어, 백혈병을 앓고 있는 대상체) 내에서 비정상적인 백혈구(예를 들어, B 세포)의 수를 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(개시된 치료법을 시행하지 않은 경우와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 치료법의 시행은 림프종의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소, 예를 들어 림프종의 크기 감소, 림프종의 부피 감소, 림프종의 성장 속도 감소, 림프종의 전이 감소, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(개시된 치료법을 시행하지 않은 경우와 비교) 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, 개시된 치료법의 시행은 다발성 골수종의 바람직하지 않은 효과의 처리 또는 감소, 예를 들어 수용자 대상체 내에서 비정상적인 혈장 세포의 수의 감소, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(개시된 치료법을 시행하지 않은 경우와 비교) 감소를 위해 사용될 수 있다.

[0152] 예를 들어, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 유전적 결함에 기인하는 악성 종양의 바람직하지 않은 효과를 처리 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체(예를 들어, 상기 목록화된 암을 앓고 있는 대상체) 내에서 암세포의 수, 종양의 크기, 종양의 부피, 또는 전이의 수를 감소시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(개시된 치료법을 시행하지 않은 경우

와 비교) 감소시킨다. 한 예에서, 개시된 치료법의 시행은 림프종의 바람직하지 않은 효과의 치료 또는 감소, 예를 들어 종양의 크기, 종양의 부피, 암의 성장 속도, 암의 전이의 감소, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 또는 적어도 90%(개시된 치료법을 시행하지 않은 경우와 비교) 감소를 위해 사용될 수 있다.

[0153] 예를 들어, 개시된 방법은 수용자 대상체 내의 유전적 결함을 원인으로 하는 신경학적 질병의 바람직하지 않은 효과를 치료 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 한 예에서, 개시된 방법은 수용자 대상체(예를 들어, 상기 목록화된 신경학적 질병을 보유하는 대상체) 내의 신경학적 기능을 증가시키는데, 예를 들어 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 적어도 70%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 또는 적어도 500%(개시된 요법을 시행하지 않은 경우와 비교) 증가시킨다.

[0154] **실시예 1**

[0155] **크라베병의 트위처 마우스 모델의 치료**

[0156] 본 실시예는 조혈모세포 이식(HSCT) 후 *GALC* 유전자(AAVrh.10-mGALC)를 보유하는 아테노 연관 바이러스 혈청형 rh.10 백터를 이용하는, 크라베병의 트위처 마우스 모델을 치료하기 위해 사용된 방법을 기재한다(Rafi *et al.*, Mol Ther. 23(11):1681-90, 2015).

[0157] 트위처 마우스는 자연발생하는 돌연변이 종으로서, *GALC* 유전자(W339X) 내의 넌센스 돌연변이에 기인한 *GALC* 활성의 부재로 나타나는 표현형을 보유한다. 상기 마우스는 성장 저해를 나타내고, 약 20일령에 떨림을 포함하는 이상 및 30~5일령까지 뒷다리 쇠약이 발생하고, 이어서 쇠약해지고, 약 40일령에 사망한다. 이때, 인간 질병과 유사한 조직병리학적 결함(예를 들어, 탈미엘린화(말이집탈락; demyelination) 및 염증성 변화)이 CNS 및 PNS에서 발견된다.

[0158] 마우스는 생후일(PND) 10일에 치료하였는데, 그 이유는 그 나이에서 타겟 임상 군집에서 유아형 질병과 더 가깝게 유사하기 때문이다. 또한, 이 전략은  $2 \times 10^{11}$  입자 유닛의 총 용량을 위해 더 많은 부피의 바이러스 입자가 투여된다. PND 9일에 부설판(30 mg/kg)에 의한 골수제거가 BMT 1일 전 및 AAVrh.10-mGALC 주사 2일 전의 조사에 의한 골수제거 대신에 사용되었다.

[0159] 이전의 연구를 통해 PND 10일에 이 벡터 단독(BMT 없음)의 정맥내 주사로 치료한 트위처 마우스가 평균 65-75일(치료하지 않은 마우스에서의 약 40일과 비교됨) 생존하였고, 및 BMT 단독(유전자 치료 없음)으로 치료한 마우스는, 일부는 더 오래 생존하였지만, 평균 65-75일 생존하였음이 확인되었다.

[0160] PND 9일에 부설판을 이용하여 16마리의 마우스를 면역억제하였고, 그 후 골수 이식(BMT)하였고, 및 이어서 24시간 후에 AAVrh.10-GALC를 단일 정맥 주사하였다. 이들은 상이한 시점(병든 마우스의 이용률 때문에)에서 이식되었기 때문에, 이때 그들의 나이는 다르다. 관련이 없는 원인으로 매우 어릴 때 사망한 마우스 1마리 이외의 나머지는 상태가 좋았고, 일부는 300일령이 지나서도 생존하였다(도 2). 그들은 그들의 체중을 유지하고, 300일령을 초과해서까지 힘과 균형을 포함하는 정상적인 거동을 나타낸다.

[0161] 이 병용 요법으로 치료된 4마리의 마우스 유래의 조직을 조사하였다. *GALC* 효소 활성은 뇌, 소뇌, 및 척수에서 정상이었으며, 좌골 신경에서 정상 초과였다. 매우 높은 *GALC* 활성은 간, 심장, 및 근육에서 측정되었다. 모든 신경 조직에서 크게 개선된 미엘린화는 병용 요법 이후에 확인되었다. 좌골 신경에서 정상적인 미엘린화는 가장 드라마틱한 발견인데, 그 이유는 이 조직은 다른 치료 방법에 의해 교정되지 않기 때문이다(도 3). 모든 신경 조직에서 훨씬 덜한 정상고 세포증이 존재하였고, 및 CD68-포지티브 세포(활성화된 대식세포)에 대한 염색은 몇몇 CD60-포지티브 세포가 확인된 척수를 제외한 모든 신경 조직에서 감소되었다. 이 데이터로부터, BMT, 이후에 AAVrh.10-mGALC의 단일 정맥내 주사는 단독 치료보다 더 양호한 결과를 제공한다. AAVrh.10은 뇌, 소뇌, 척수, 및 좌골 신경에 충분한 *GALC* 활성을 제공하고, 및 BMT는 이 질병에서 확인된 염증의 제어에 조력한다.

[0162] 따라서, 조혈모세포 이식(HSCT) 직후에 AAVrh.10-mGALC의 정맥내 주입은 트위처 마우스에서 질병의 진행을 신속하게 중단시켰다. 이 병용 치료는 어느 하나의 치료 단독에 비해 더 양호한 결과를 제공하였다. AAVrh.10-GALC는 뇌, 척수, 및 말초 신경에 *GALC* 활성을 신속하게 공급하고, HSCT는 크라베병에서 확인된 염증을 제어한다.

[0163] **실시예 2**

[0164] **투여의 시기**

- [0165] 본 실시예는 트위처 마우스에서 3개의 시점, 즉 생후일(PND) 11일, 15일 및 20일에서 HSCT 이후 주입된 정맥내 AAVrh.10-GALC의 효능을 비교하기 위해 사용될 수 있는 방법을 기재한다.
- [0166] 이전 연구에서, 마우스에게는 HSCT 1일 후 및 화학요법 2일 후 AAVrh.10-GALC를 투여하였다. 그러나, HSCT와 가깝게 AAVrh.10을 주입하는 것은 인간에서는 시행되지 않아 왔다. 따라서, 공여자 세포 귀환 및 재증식이 발생할 경우, 수일 후(이식 후 ~14일)에 AAVrh.10-GALC를 투여한다면 유사한 효과가 얻어질 수 있는지 결정될 것이다. 공통 유전자 이식된 마우스에서 완전한 조혈 재증식이 HSCT 10일 후 이내에 발생하고(Sadelain *et al.*, *J. Immunol.* 144:1729-36, 1990); 따라서, HSCT의 효능은 PND 10일에 수행될 것이고, 이어서 PND 11일, 15일 및 20일에 AAVrh.10-GALC이 투여될 것이다.
- [0167] 4개의 그룹에 무작위로 할당된 46마리의 마우스에게 PND 10일, 30 mg/kg의 부설판 투여 1일 후에 공통 유전자 HSCT를 투여할 것이다.  $3-5 \times 10^7$  세포는 0.2 ml의 멸균 무혈청 DMEM 중에 현탁하고, 이어서 IP 투여한다. 4개의 그룹 중 3개의 그룹(각각의 그룹은 10마리)에게는 HSCT 후 1일, 5일 또는 10일(PND 11일, 15일, 20일)에 AAVrh.10-GALC의 1회 용량을 투여할 것이다. 단지 HSCT로 처리한 4번째 그룹(n=16마리의 마우스)은 대조군으로 기능할 것이다. 주된 결과 측정치는 150일까지의 생존 및 PND 60일 및 PND 90일에서의 중량(생존하는 마우스에서의 전체적인 건강상태를 평가하기 위함)일 것이다. 희생된 마우스로부터 뇌 조직(피질, 소뇌, 뇌간), 간, 심장, 골격근, 비장 및 좌골 신경을 수집하고, 효소 활성 및 면역 조직 화학에 의해 분석되는 바와 같이 GALC 분포를 비교할 것이다.
- [0168] **실시예 3**
- [0169] **AAVrh10-GALC의 용량**
- [0170] 본 실시예는 장기간 생존을 위해 트위처 마우스에서 HSCT 이후의 정맥내 AAVrh.10-GALC의 최소 용량을 확립하기 위해 사용될 수 있는 방법을 기재한다.
- [0171] AAVrh.10-GALC의 최소 유효 용량(즉, 생존에서 통계학적으로 유의미한 개선을 나타내는 최소 용량)이 결정될 것이다.  $4 \times 10^{13}$  게놈 카피(gc)/kg의 정맥내 AAVrh.10-GALC 용량이 조사한 최대 용량이 될 것이다. 최저 용량은 10에 2승 더 낮은  $4 \times 10^{11}$  gc/kg이 될 것이고, 이는 또한 인간에 대해 잘 조정된다. 중간 용량은  $4 \times 10^{12}$  gc/kg이 될 것이며, 이는 약  $2 \times 10^{13}$  gc의 인간 신생아에 대한 총 용량에 상응한다. 트위처 마우스에서 최대 테스트 용량이 다른 용량보다 더 긴 생존을 나타내는 경우, 더 높은 용량이 테스트될 수 있다.
- [0172] 실시예 2에서와 같이, 4 그룹의 마우스에게 PND 10일, 30 mg/kg의 부설판 투여 1일 후에 공통 유전자 HSCT를 시행할 것이다. 실시예 2에서 결정된 최적 일에, 4개의 그룹 중 3개의 그룹(각각의 그룹에서 n=10)은  $4 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{12}$ , 또는  $4 \times 10^{11}$  gc/kg에서 AAVrh.10-GALC의 1회 용량으로 처리될 것이다. 단지 HSCT로 처리한 4번째 그룹(n=16마리의 마우스)은 대조군으로 기능할 것이다. 주된 결과 측정치는 150일까지의 생존 및 PND 60일 및 PND 90일에서의 중량일 것이다.
- [0173] **실시예 4**
- [0174] **개에서 크라베병의 치료**
- [0175] 본 실시예는 마우스에서 확립된 최적 시기 및 최저 유효 용량을 이용하여, 면역 제거, HSCT, 및 HSCT 후 정맥내 AAVrh.10-GALC 주입을 이용하는 크라베병의 개 모델을 치료하기 위해 사용될 수 있는 방법을 기재한다.
- [0176] GALC 돌연변이에 대해 이형의 개는 펜실베이니아 대학의 수의학 교실에서 확립하였다. 조사(radiation)는 크라베병 개에서 면역제거 방법으로서 통상적으로 사용되어 왔다; 그러나, 이 방법은 인간에게 현재 사용되는 조건화 레지먼을 반영하지 않는다. 화학요법 기반 방법은 개에서는 테스트되어 왔으나, 본 실시예는 크라베병 개에서 HSCT 이전에 화학요법 기반 조건화를 조사한 최초의 사례가 될 것이다.
- [0177] 2마리의 개는 개를 위해 개발되었으나 크라베병 개에서는 이전에 테스트되지 않은 화학요법 기반 레지먼을 이용하여 이식될 것이다. 개들에게는 30일 동안 시클로스포린이 투여될 것이고(인간 치료를 모방하기 위함), 이어서 부설판 레지먼의 개시 이전 2주 동안  $\sim 0$  mg/kg/일로 히드록시우레아를 경구 투여할 것이다. HSCT  $\sim$ 일 및  $\sim$ 일 전에, 개들에게 5 mg/kg/일의 부설판(9 mL 염수 중에 희석된 1 mL 부설판)을 시린지 펌프를 이용하여 1시간의 기간에 걸쳐 정맥내 투여할 것이다. 주된 결과 측정치는 정상 혈구 수치로 24주를 넘어 생존하는지가 될

것이고, 이 경우 조사를 수반하지 않는 이식은 성공적인 것으로 간주될 것이다. 24주에 살아있는 모든 개들은 조직병리학적 연구를 위해 희생될 것이다.

[0178] 개들은 다음 그룹들 중 하나의 그룹에 무작위로 할당될 것이다: 미처리(n=2), HSCT 단독(n=3), 또는 HSCT+AAVrh.10-GALC (n=3). AAVrh.10-GALC 처리의 용량 및 시기는 마우스에서의 결과(실시에 2 및 3)에 기초할 것이다. 처리 대 미처리 개의 결과는 12주에 비교될 것이고, 치료 그룹(HSCT 단독 대 HSCT+AAVrh.10-GALC)의 결과는 24주에 비교될 것이다.

[0179] 주된 결과 측정치는 확산 텐서 영상 및 분획 이방성 측정을 이용하는 뇌 MRI 및 신경 전도 속도의 결과를 포함할 것이다. 탐색 결과는 운동실조 및 미진(떨림)의 개시를 포함할 것이다. 이식 후 생존이 조사될 것이지만, 24주에 여전히 생존하는 모든 개들은 희생시켜 효소 활성 분석 및 면역 조직 화학에 의한 GALC 분포의 평가 및 조직병리학적 연구를 위해 뇌 조직(피질, 소뇌, 뇌간), 경부 척수, 말초신경(감각, 운동 및 자율), 간, 신장, 심장, 사두근, 생식선, 비장, 소장 및 대장, 부신, 및 피부를 수집할 것이다.

[0180] 실시예 5

[0181] 래트에서 크라베병의 치료

[0182] 본 실시예는 래트에서 수행될 독성학 연구를 기재한다. 정맥내 AAV는 UCBT 1일 후 면역제거된 래트에게 전달될 것이다. 새로운 면역계는 보통의 GALC 효소를 보유하고, 따라서 단순 환자가 하는 방식으로 GALC 효소에 반응하지 않아야 한다.

[0183] 독성학 연구는 피서 433 래트에서 수행될 것이다. 골수 공여체로서 스프라그-도레이 래트의 사용은 트위치 마우스에서 사용된 자가 BMT와는 대조적으로 진정한 동종이계 BMT를 제공한다(참조: 실시예 1). 소형 설치류를 사용하면 그룹당 각각의 성별로 n=5가 가능하고, 마우스에 비해 더 큰 크기의 래트는 희생 시 한 동물로부터 완전한 혈구 계수 및 혈청 화학 테스트를 위해 충분한 혈액의 더 용이한 수집을 가능하게 한다. 젓을 땀 래트(21일령)가 사용될 것인데, 그 이유는 면역억제, BMT, 및 AAV 투여를 위한 대규모의 취급을 위한 필요때문이다.

[0184] 처리 그룹의 개요는 표 2에 나타난다. 인간 또는 래트를 위해 의도된 AAVrh.10-hGALC 벡터가 사용될 것이다. 인간 GALC 유전자가 래트에서 사용될 것이기 때문에, (그들은 면역억제될 것이지만) 면역원성의 가능성이 있다. 응집을 최소화하고, 및 혈액 뇌 장벽의 투과를 최대화하기 위해, 상기 벡터는 인간을 위해 의도된 바와 같이 5% 소르비톨과 함께 380 mM PBS 중에서 제형화될 것이다. BMT 단독으로부터는 이식편 대 숙주 질병(GVHD)을 포함하는 합병증의 가능성이 있다. 따라서, 음성 대조 그룹 및 AAVrh.10-hGALC 대신에 BMT + 비히클로 처리한 그룹이 조사될 것이다. 또한, 정맥내 AAV의 부작용은 BMT에 의해 증강될 수 있고; 따라서 AAV 단독 투여된 그룹이 조사될 것이다.

[0185] [표 2] 래트에서 조합된 AAVrh.10-hGALC 및 BMT의 안전성 평가를 위한 처리 그룹

그룹	동물 #	면역억제 및 BMT <sup>1</sup>	AAVrh.10-hGALC <sup>2,3</sup>	시점(일) <sup>3</sup>
A	1-30	+	비히클	7, 30, 180
B	31-60	+	4×10 <sup>12</sup> gc/kg	7, 30, 180
C	61-90	+	4×10 <sup>13</sup> gc/kg	7, 30, 180
D	91-120	+	달성 가능한 최대, (2×10 <sup>14</sup> gc/kg)	7, 30, 180
E	121-150	-	달성 가능한 최대, (2×10 <sup>14</sup> gc/kg)	7, 30, 180
F	151-180	-	비히클	7, 30, 180

[0186]

[0187] <sup>1</sup> 면역억제. 부설관, 1일 후 미코페놀레이트 모페틸 및 4일 후 타크롤리무스.  $1 \times 10^7$  스프라그-도레이 공여 래트의 골수로부터의 분획되지 않은 단핵 세포가 주입될 것이다.

[0188] <sup>2</sup> AAV 유전자 전달. BMT 1일 후, 래트에게 CMV-증강된 병아리 β-액틴 프로모터에 의해 구동된 인간 GALC cDNA를 발현하는 AAVrh.10의 정해진 용량을 정맥내 주사할 것이다.

[0189] <sup>3</sup> 래트(시점당 각 성별의 n=5)는 바르비투레이트 처리에 의해 희생시키고, 심장 천공을 이용하여 완전한 혈구 계수 및 혈청 화학 테스트를 위한 혈액이 수집된다. 래트는 임의의 총 이상에 대해 조사될 것이고, 기록되고, 및

절제될 것이다. 후술하는 장기가 제거되고, 중량이 측정될 것이다: 간, 신장, 심장, 및 폐. 후술하는 장기의 샘플이 조직병리학적 조사 및 임의의 이상 발견을 위해 채취될 것이다: 부신, 뇌(피질, 소뇌), 결장, 횡경막, 십이지장, 부고환, 식도, 총 병변, 심장, 회장, 신장, 간, 폐/기관지, >2 림프절, 골격근, 좌골 신경, 난소, 췌장, 척수, 비장, 고환, 및 자궁. 각각의 장기에 대한 헤마톡실린 및 에오신 염색된 부분의 맹검 평가가 수행된다. 동일한 조직의 예비 샘플은 유지될 것이고, qPCR에 의해 백터 수준에 대해 분석될 것이다.

[0190] 사용되는 백터에 대한 로트-릴리즈 기준은 표 3에 나타난다. 모든 백터는  $\leq -60^{\circ}\text{C}$ 에서 액적으로 저장되고, 사용되는 날에 해동될 것이다.

[0191] [표 3] AAVrh.10 hGALC 백터에 대한 로트 릴리즈 기준

	테스트 / 상세	독성학 등급
멸균율	3 개의 테스트 배지에서 관찰된 성장 없음, 14 일	AppTec
미코프라스마	검출되지 않음	AppTec
내독소	LAL (엔도세이프) <10 EU/mL	인 하우스
역가	293T 세포를 감염, 상등액에서 GALC 활성 분석, 결과 기록	인 하우스
게놈 구조	서열결정으로 확인된 패키징된 DNA(ITR 사이) 확인	인 하우스
순도	SDS-PAGE, 다른 최소한의 가시적인 밴드와 함께 1:1:10 비율로 VP1, VP2, 및 VP3 에 대한 3 개의 밴드를 나타냄	인 하우스
정체	항-AAVrh.10 항체를 이용하는 웨스턴 블롯; VP1, VP2, 및 VP3 밴드의 존재	인 하우스
외관	투명 및 무색	인 하우스
pH	테스트 스트립, pH 6.5-7.5	인 하우스
농도	qPCR, $> 2 \times 10^{13}$ gc/ml	인 하우스
시/시험관내 외래성 바이러스	3 개의 세포주, 세포변성 효과 없음	AppTec
복제 가능 AAV	아데노바이러스 헬퍼 바이러스의 존재 하에서 293T 세포에 대한 희석 제한, AAV 복제 없음	인 하우스
숙주 세포 DNA 의 존재	qPCR; 투여당 <100 ng	인 하우스
숙주 세포 단백질의 존재	결과 기록	인 하우스
캡시드의 엠티:폴 비율	투과 전자 현미경; $\geq 50\%$ 전체 캡시드	인 하우스
잔류 플라스미드 DNA	qPCR; $10^9$ AAV 입자당 $\leq 100$ pg	인 하우스

[0192]

[0193] 정맥내 주사에 의한  $4 \times 10^{13}$  gc/kg AAVrh.10-mGALC의 타겟 용량이 사용될 것이다. 트위처 마우스에게는  $2 \times 10^{11}$  gc를 투여하였는데, 이는 약  $4 \times 10^{13}$  gc/kg 체중과 동일하다. 크라베병으로 새롭게 진단된 5 kg 유아의 경우, 이는 총  $2 \times 10^{14}$  gc에 해당된다.

[0194]  $4 \times 10^{13}$  gc/kg의 타겟 인간 용량에 기초하여, 래트는 A) 타겟 용량; B) 0.1x 타겟 용량 및 C) 달성 가능한 최대 용량에서 평가될 것이다. 주사 부피가 200  $\mu\text{l}$ 이고 높은 등급의 백터가  $2 \times 10^{13}$  gc/ml로 제공될 수 있고, 래

트가 40 g인 경우, 달성 가능한 최대 용량은  $2 \times 10^{14}$  gc/kg이다.

[0195] 래트는 7일, 30일, 및 180일에 희생될 것이다. 주입 후 7일에, AAVrh.10-hGALC 주입에 기인하는 임의의 활성 감염이 명백할 수 있고; 30일에 면역계가 완전히 재구성되고, 및 임의의 항-AAV 또는 항-트랜스유전자 반응이 명백할 것이며; 및 180일에 장기 효과가 명백할 것이다. 이 더 긴 시점은 신생 마우스 내로 정맥내 AAV 주사 후 간 암종의 가능성과 관련된다.

[0196] 실시예 6

[0197] 인간에서 크라베병의 치료

[0198] 본 실시예는 유아형 크라베병을 앓고 있는 유아에서 정맥내 유전자 치료(AAVrh.10-hGALC) + 혈연관계가 아닌 (unrelated) UCBT를 이용하는 병용 치료의 안전성 및 임상 결과를 평가하기 위한 오픈 라벨 I/IIa 상 연구를 기재한다. 질병 관련 결과 파라미터는 일련의 표준화된 신경발달 테스트(인지 및 운동 스킬 포함), 뇌 MRI, 신경전도 연구, 및 요추 천자의 결과를 포함하는데, 이들은 베이스라인, 치료 100일 후, 및 총 5회의 방문 후 3개월마다 수행될 것이다. 이 간격이 필요한데, 그 이유는 이 간격은 아기의 빠른 뇌 성장의 시간을 나타내기 때문이다. 공식적인 연구 기간의 종료 후 적어도 5년 동안 연간 후속 조사가 수행될 것이다.

[0199] 샘플 크기(8명의 환자)는 질병의 희귀성에 기초하는 물리적인 및 실질적인 고려사항들에 따라 선택되어 왔다. 샘플 크기가 작음에도 불구하고, 이는 희귀병의 경우 전형적이다. 다행스럽게도, 임상적 관심인 효과 크기는 환자간 변동성에 비해 크다. 초기 진단된 크라베병 환자를 위한 치료의 이전 연구들은 1.5-2.0 표준편차의 집단 효과 크기를 제한한다. 그룹당 4명의 환자는 작은 샘플임에도 불구하고, 상기 연구는 크라베병 그룹과 전형적인 발달을 보여주는 대조군 영아들 사이의 1.25 표준편차의 차이를 검출하는 양호한 능력을 보유할 것이다. 그러나, 환자간 변동성을 더 양호하게 예측하기 위해, 상기 연구는 수직적인 데이터를 수집할 것인데, 이는 부트스트랩 분석으로 분석될 것이다.

[0200] 8명의 환자는 2개의 용량 집단(cohort)으로 구분될 것이다(표 4). 4명의 환자에게 최저 벡터 용량으로, 이어서 더 높은 용량 집단에서 4명의 추가 환자에게 AAVrh.10-hGALC/UCBT가 부여될 것이다. 제1 그룹에게는 표준 감소된-강도 조건화 화학요법 레지던 및 혈연관계가 아닌 UCBT(후술하는 내용 참조)가 부여될 것이다. UCBT 후 그날에 조건이 맞는 아기에게는 인간 GALC cDNA를 발현하는 AAVrh.10을 1회 정맥내 주사할 것이고, 이들은 수혈 비의존적이고, 이식되고, 안정한 것으로 간주될 때까지 병원 내에 잔류될 것이다. AAVrh.10-hGALC를 투여하지 않은 환자에 기초하면, 이는 적어도 4주가 소요될 것이고; 따라서, 대상체들은, 벡터 관련 부작용이 빈번하게 일어나는 경우, 유전자 전달 기간 직후 동안 이식 유닛 내에서 매일 모니터링될 것이다. 그 후 3개월 간격으로, 상기 대상체들에 대해 포괄적인 평가가 시행될 것이다(표 5). 그룹 A에서 첫 번째 대상체는 후속 대상체가 등록하기 전 3개월 동안 추가 조사될 것이다.

[0201] [표 4] 조합된 정맥내 AAVrh.10-hGALC 및 UCBT를 위한 환자 그룹

집단	환자의 수	용량
A	4	0.25× 타겟 용량
B	4	$4 \times 10^{13}$ gc/kg의 타겟 용량 (계류중인 전임상 안전성 연구)

[0202]

[0203] 심하게 면역억제된 환자에서 AAV-매개된 유전자 치료의 이용에 대한 전례는 없다; 따라서, 이 I/IIa 상 연구는 주로 안전성에 집중될 것이다. 결과적으로, 상기 연구는 동시적인 대조 그룹 없이 수행될 것이다. 그러나, 동일한 파라미터로 표준 프로토콜을 이용하여 장래적으로 평가되어 온 공지된 유아형 크라베병 환자는 미처리 환자(n=79) 및 UCBT로 처리된 환자(n=54) 둘 다에서 질병의 예상된 코스를 나타낸다. 이들 기존의 데이터는 결과 파라미터뿐만 아니라 그러한 측정치의 표준 편차에서 예상된 시간 의존성 변화를 결정하기에 충분하다. 이는 화학요법으로 치료된 이들 환자에서 질병 진행의 공식적인 통계학적 평가를 가능하게 한다.

[0204] 8명의 환자들은 성별, 인종, 또는 민족성과 관계없이 등록될 것이다. 포함 기준을 다음과 같다:

- [0205] 1. 유아형 크라베병의 확인된 진단, 백혈구에서 갈락토세레브로사이드 β 갈락토시다아제(GALC) 활성 < 0.20 nmol/h/mg 단백질, 및 베이스라인 방문 후 2개의 병원성 GALC 돌연변이.
- [0206] 2. 스크리닝 시의 연령: 1일 내지 12개월.

- [0207] 3. 신경촬영법, 신경 전도 연구, 또는 뇌간 청각유발전위 검사에서의 이상
- [0208] 4. 혈연관계가 아닌 UCBT의 대상.
- [0209] 5. 임상 프로토콜에 부합할 수 있는 부모(들) 및/또는 법정 후견인
- [0210] 제외 조건은 다음과 같다:
- [0211] 1. 이전 HSCT의 이력.
- [0212] 2. 공지된 임상적으로 유의미한 심혈관, 간, 폐, 또는 신장 질환 또는 다른 의학적 상태.
- [0213] 3. 중요한 선천적 이상의 존재.
- [0214] 4. 활성 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 헤르페스바이러스, 또는 아데노바이러스의 활성 감염 또는 이력의 징후를 포함하는, 스크리닝 시의 이상 혈액 테스트.
- [0215] 5. PI의 의견으로 연구에의 참가를 제외하여야 하는 임의의 다른 의학적 상태, 중증 병발성 질병, 또는 경감 사유.
- [0216] 6. 임상 조사와 관련된 다른 연구에 연구 등록되거나 또는 현재 등록되기 이전 30일 내에 임의의 시험용 의약품의 사용.
- [0217] 7. 환자의 부모(들) 및/또는 법정 후견인이 연구의 성질, 범위, 및 가능한 결과를 이해할 수 없는 경우.
- [0218] 8. PI에 의해 결정된 바와 같이, 환자가 프로토콜에 순응하지 않는 경우(즉, 후속 평가를 위해 복귀할 수 없거나, 또는 연구를 완료할 것 같지 않은 경우).
- [0219] **면역억제 및 제대혈 이식**
- [0220] 6 HLA-매칭된 공여자의 4-6으로부터의 제대혈 이식은 예비증상을 보이거나 또는 최소한의 증상을 보이는 크라베병을 위한 표준 치료법으로 고려된다. 환자들에게는 감소된 독성 조건화 레지먼이 수행되는데, 이는 이식 관련 발병률 및 사망률을 감소시킨다. 이 화학요법 레지먼의 골자는, 크라베병 및 다수의 다른 비악성 질환의 표준 치료법으로서 사용되어 온 부설판의 골수 소멸성 용량이다. 더구나, 부설판은 대부분의 유전자 치료 시도에서 선택되어 온 화학요법제이다. 환자들에게는 GVHD 예방을 위한 미코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타크롤리무스와 함께 알렘투주맙(0.5 mg/kg), 히드록시우레아(30 mg/kg/일), 플루다라빈(1 mg/kg/일 × 4일), 부설판(약 4 mg/kg/일 × 3일)이 투여될 것이다.
- [0221] 부설판은 치료 약물 모니터링 및 850 mg/dl의 타겟팅된 정상 상태 농도를 달성하기 위한 용량 조절을 수행하면서 ~2 mg/kg으로 3일에 걸쳐 투여될 것이다. 더 낮은 부설판 노출은 이식 실패, 특히 주입된 CD34+ 전구세포 용량 및 총 유효 세포 **용량**이 골수 이식보다 ~ 로그 너 낮은 제대혈 이식의 실패를 초래할 수 있다.
- [0222] 환자들에게는 면역억제성 약물이 투여될 것인데, 이는 정맥내 타크롤리무스(~.05 mg/kg/일로 시작) 및 이식 2일 전부터 시작하는 정맥내 MMF를 포함할 것이다. MMF(45 mg/kg/일로 개시, 3회 용량으로 분할)는 우리들의 표준 레지먼으로서 최초 28일 동안 투여될 것이고, 이어서 2-4 등급 GVHD의 부재 하에서 신속하게 감소될 것이다. 경구 투여로의 전환은 내성에 맞게 3-4주 후에 수행될 것이다. 타크롤리무스(또는 그의 대체물 시클로스포린 A)는 이식 후 최초 3-4개월 동안 계속될 것이고, 및 이어서 환자는 GVHD의 부재 하에서 2-3개월에 걸쳐 컷을 폐기될 것이다. 면역억제요법의 안전성 모니터링은 최초 3-4주 동안 매일 수행되고, 그 후에 임상 지표에 따라 타크롤리무스가 중단될 때까지 수행되는 혈액 검사를 포함할 것이다. 안전성 혈액 검사는 안전 혈구 측정/차등/망상적혈구, 포괄적인 대사 패널, 및 타크롤리무스 수준을 포함할 것이다. 환자들은 표준 이식 프로토콜에 따라 부작용에 대한 모니터링이 계속될 것이다.

[표 5] 이식 이전에 수행된 평가

			0 ~ 6 mo	> 6 mo
이력 및 검사		병력, 이전 치료 독성, 활동도(랜스키 또는 키모스포키), 면역화 이력, 신장, 체중, BMI, 생명 징후 연령 10-18: 태너 단계	X	X
기본 랩	혈액	CBC+Diff, PT/PTT, 피브리노겐, ABO/Rh, 기초 대사 패널, 간 기능 검사, 신장 기능 검사 생리 검사 여성만; 혈청베타-hCG	X	X
감염성 질병 랩	혈액	항체 역가: PCR 에 의한 HBsAg, HBc, HCV, HIV/HCV/HBV NAT IDS, WNV NAT IDS, HIV I/II, HTLV I/II, CMV, Et. 크루지, 매독 검사; EBV, VZV, HSV, 톡소플라스마, ADV <u>EBV PCR, VZV PCR, HSV PCR, CMV PCR</u>	X	X (IVIG 를 받는 경우)
감염성 질병 랩	호흡기 (NP 스왑)	호흡기 바이러스 패널	X	X
감염성 질병 랩	대변	PCR 에 의한 ADV, PCR 에 의한 노로바이러스, PCR 에 의한 세, 디포 <u>PIID 환자만: 종란 &amp; 기생충</u>	X	X
분자 테스트	혈액	키메라짐에 대한 DNA(예를 들어, STR 분석), HLA 타이핑, 패널 반응성 항체(PRA)	X	X
장기 연구		심장초음파, EKG, 폐 기능 검사	X	X
이미지화		흉부 X-선; CT 뇌, 부비강, 흉부부, 골반	X	X

[0223]

[0224]

		조사-민감성 염색체 절단 증후군(예를 들어, 선천성 각화 이상증)는 예외 다음 검사를 받을 것임: 뇌, 부비동, 흉부, 복부, 골반의 MRI		
약품 레벨	혈액	알렘투주맙 레벨 - 투여 이전		X
리서치 연구	혈액	면역 재구성 샘플: 그린 탐 투브 내 2 mL 혈액, 1 mL/kg 초과하지 않음	X	X
		추가 리서치 면역 연구(면역 회복, 특이적인 바이러스 면역) 샘플: 그린 탐 투브 내 2 mL 혈액(상기와 공유 가능)	X	X
신경 발달 평가		행동 청력검사, 뇌간 청각 유발 전위, 시각 유발 전위, 조기 학습의 물렌 척도, GMFM, 시력 검사 CSF 단백질, 척추 MRI, 신경 전도 속도, EEG, 돌연변이 분석, GAIC 효소 레벨	X	X

[0225]

[0226]

이식 이후, 하기 항목이 평가될 것이다:

[0227]

1. CBC - 0일부터 호중구 이식까지 주당 3회, 이어서 28일까지 주당 2회 및 12주까지 주당 1회. 망상적혈구 계수는 CBC와 함께 매주 수행될 것이다.

[0228]

2. 기초 대사 패널 및 간 기능 검사 - 28일까지 주당 2회, 이어서 12주까지 매주.

[0229]

3. 아데노바이러스 - 혈액 PCR 주당 2회, 이어서 +50일 또는 이식 후 배출(어느 것이나 더 빠른 쪽)까지; 이어서 100일까지 매주 알렘투주맙.

[0230]

4. CMV: 사전 바이러스 노출이 없는 경우 - 혈액 PCR 100일까지 매주; 의심되는/확실한 CMV 노출의 경우, 혈액 PCR 주당 2회, 이어서 +50일 또는 이식 후 배출(어느 것이나 더 빠른 쪽)까지; 이어서 100일까지 매주 알렘투주맙.

[0231]

5. EBV PCR - 2주 마다, 이어서 100일까지 알렘투주맙.





- [0242] 히드록시우레아는 알약 크기에 가장 가깝게 등근 30 mg/kg의 단일 매일 용량으로 경구 투여될 것이다. 5 mcg/kg(최대 300 mcg)으로 PRN G-CSF의 이용은 <750 세포의 ANC를 촉진시킨다. G-CSF의 사용에도 불구하고 ANC가 <500 세포/ $\mu$ l로 감소되는 경우, 히드록시우레아는 중지될 것이다.
- [0243] 알렘투주맵은 현행 기관 가이드라인에 따라 IV로 투여될 것이다. 알렘투주맵의 단일 용량은 -10일 또는 -9일에 0.5mg/kg/투여일 것이다. 적합한 예비 투여 약물은 기관 가이드라인에 따라 투여될 것이다. 알렘투주맵의 주입 중 또는 후에 환자의 체온이 >38.5°C인 경우, 혈액 배양물이 채취될 것이고, 항생물질 적용범위가 추가될 것이다.
- [0244] 플루다라빈은 -9일 내지 -5일에 매일 1시간에 걸쳐  $\times 5$  용량으로 30 mg/m<sup>2</sup>/투여(또는 1 mg/kg/투여, 어느 것이나 낮은 쪽)의 용량으로 정맥내 투여될 것이다.
- [0245] *약물 투여*
- [0246] 조정 이상 체중(AIBW)은 그들의 이상 체중(IBW)의 >125% 중량을 보유하는 비만 환자를 위해 사용될 것이다. kg으로 IBW 계산(CHP 소아 약물 요법 핸드북): 영아들(1-2살): <60 인치: IBW = (신장<sup>2</sup> [cm]  $\times$  1.65)/1000; > 60 인치: 남성: IBW = 39 + (2.27  $\times$  5 피트 초과 신장(인치)), 여성: IBW = 42.2 + (2.27  $\times$  5 피트 초과 신장(인치)). 실제 체중(ABW)으로부터 조정 IBW(AIBW) 계산: AIBW = IBW + [(0.25)  $\times$  (ABW-IBW)]
- [0247] *제대혈 선택 및 주입*
- [0248] 최적의 이용 가능한 유닛은 HLA(대립유전자 레벨 HLA-DRB1 타이핑으로 6 HLA 매치의 최소 4), 총 유핵 세포 용량(최소 3.0  $\times 10^7$ /kg AIBW), CD34+ 전구세포 용량(최소 1.5  $\times 10^5$ /kg AIBW) 및 역가에 영향을 주는 다른 인자(예를 들어, 유전적 효소 결핍 환자의 효소 활성화)에 기초하여 선택될 것이다. UCB 유닛은 해동될 것이고, 희석하여 또는 희석하지 않고 주입될 것이다. 해동된 제대혈 또는 살아 있는 혈연관계가 아닌 공여자 골수 이식편의 5% 이하의 향후 주입을 위해 0일에 재냉동될 것이다. 모든 생성물은 조사되어 이식편 대 숙주 질병의 위험을 감소시킬 것이다. 추가로, 모든 생성물은 CMV-안전(CMV를 함유할 수 있는 백혈구는 제거됨)할 것이며, 여과되어 적혈구 및 백혈구를 걸러내어 HLA 항체 형성의 발생 정도를 감소시킬 것이다. 환자들에게는 적혈구 및 혈소판이 수혈될 것이다.
- [0249] 매일 IV 또는 SC로 5 mcg/kg/투여의 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF)를 투여하는 것은 +1일에 시작되어 ANC가  $\geq 2,000$ 이 될 때까지 계속될 것이다. 그 후, G-CSF의 용량 조정 중단은 개별적인 환자 상태에 기초하여 결정될 것이다. 총 비경구 영양법(TPN) 및 인트라리피드를 이용하는 정맥내 영양법은, 경구 섭취가 현저히 감소되는 경우 개시될 것이고, 및 일단 경구 섭취가 개시되면, 의사의 판단에 따라 감소/중단될 것이다. 간 기능, 단백질/알부민, 및 트리글리세라이드 레벨은 IV 영양법 중에 면밀히 모니터링될 것이다.
- [0250] *GVHD*
- [0251] 예방을 위해, 환자들에게 타크롤리무스 및 GVHD 예방을 위한 미코페놀산 (MMF/셀셀트)을 투여할 것이다. IV 타크롤리무스의 연속적인 주입 또는 Q12h 투여는 -2일에 개시될 것이고, 일단 환자가 PO 흡수를 견디게 되면 경구 투여로 전환될 수 있다. 연속 주입 시 타크롤리무스 레벨은 LC/MS 방법을 이용하여 12-15 ng/ml의 정상 상태 레벨을 목표로 매주 적어도 3회 모니터링될 것이다. Q12 간헐 투여의 경우, 타겟 스투 레벨은 8-10 ng/ml 사이가 될 것이다. 미코페놀산(15 mg/kg/투여)은 -2일 개시 2시간부터 2-4 등급의 급성 GVHD의 부재 하에서 다음 주에 이유와 함께 28일까지 8시간 마다 정맥내 투여될 것이다. MMF의 조기 이유 또는 타크롤리무스의 더 낮은 타겟 범위는 독성에 대한 염려, 또는 활성 바이러스 감염 및/또는 지연된 림프구 회복이 있는 경우에 발생할 것이다.
- [0252] 급성 GVHD의 진단 및 치료는 현행 BMT CTN 가이드라인을 반영하는 현행 기관 가이드라인에 기초할 것이다. 만성 GVHD의 진단은 임상 데이터 및/또는 조직병리학적 데이터 및 현행 표준 진단 기준에 기초할 것이다.
- [0253] *감염*
- [0254] 조건화 이전에, 모든 환자는 임의의 피부 또는 점막 감염이 없어야 한다. 뇌, 부비강, 흉부, 복부, 및 골반의 CT 스캔은 이식 전에 확보되어 금지하지 않는다면 잠재 감염에 대해 스크리닝될 것이고, 이 경우 대체 이미징화가 수행될 것이다. 모든 환자들에게는 클로르헥시딘 글루코네이트 베스(히비클렌스)가 시행될 것이다. 환자들은 특히, 마취제를 투여하는 경우, 변비에 대해 모니터링될 것이고, 지시에 따라 대변 연화제가 투여될 것이다. 모든 환자들은 HEPA 여과되는 개인실이 제공될 것이다.

- [0255] 환자들에게는 (설과제에 알레르기가 없다면) 주폐포자충(카리니) 페렴(PCP)을 예방하기 위해 설과메톡사졸-트리메토프림(박트림)이 투여될 것이고; 이는 조건화 중에 시작할 것이다. 펜타미딘 또는 적절한 대체물은, 임상적으로 금지되지 않는다면, +28일에 시작하여 면역 재구성이 발생할 때까지(전신성 스테로이드의 부재 하에서 CD4+ T 세포 >300 세포/mm<sup>3</sup>) 투여될 것이다. 펜타미딘은 경구 박트림 또는 대안적인 경구 PCP 예방으로 변경될 수 있다.
- [0256] 감염 또는 노출에 기인하는 양성 HSV 및/또는 VZV 혈청학 및/또는 수두 감염의 이력을 가진 환자들에게는 아시클로비르가 정맥내 투여될 것이다. PO 흡수를 건디는 경우, 아시클로비르는 경구로 변경할 수 있다. 환자에게 간사이클로비르, 포스카르네트 또는 시도포비르가 투여되는 경우, 병용 요법이 적절하지 않으면, 아시클로비르도 투여할 필요는 없다. 예방은 전신성 스테로이드 및 임상적으로 유의미한 레벨의 다른 전신성 면역억제제의 부재 하에서 CD4+ T 세포 >250 세포/mm<sup>3</sup>까지 계속될 것이다. 예방은 이들 약물의 악영향이 중단을 보증하지 않는다면, 이식 후 6개월 이전에 중단될 것이다.
- [0257] HSV/VZV 예방은 사전의 HSV/VZV 감염 또는 노출의 임상적 증거가 없는 후술하는 환자의 경우에는 불필요한데, 그 예로는 양성 혈청학이 음성 HSV/VZV PCR을 이용하는 IVIG의 이용에 기인하는 경우; 음성 HSV/VZV PCR을 이용하는 6개월 미만의 환자에서 IgG의 모계 전이에 기인하는 양성 혈청학; 또는 면역화에 기인하는 양성 혈청학을 들 수 있다.
- [0258] 등록시에 HSV/VZV 바이러스 혈증을 보유하거나, 또는 이식 이전에 바이러스 혈증이 발병한 환자는 치료될 수 있다.
- [0259] 양성 CMV 혈청학 또는 타액, 소변 또는 다른 부위에서 검출 가능한 바이러스를 보유하지만, 검출 가능한 바이러스 혈증은 없는 환자에게는 조건화 중 -12일부터 -2일까지 유지 용량(전형적으로 매일 5 mg/kg IV)으로, 간사이클로비르 또는 다른 CMV-특이적 치료, 이어서 신부전을 위해 용량을 조정하여 +1일부터 시작하여 +100일까지 8시간 마다 아시클로비르 500 mg/m<sup>2</sup> IV을 투여할 것이다. 매일의 포스카르네트(90 mg/kg/일)는 대체될 수 있다. 이식 전에 CMV 바이러스 혈증을 가진 환자들에게는 제대혈 주입 전 및 도중에 적절한 항-CMV 치료를 시행할 수 있다. CMV 예방은, 사전의 CMV 감염 또는 노출의 임상적 증거가 없는 경우, 예를 들어 양성 혈청학이 음성 CMV PCR을 이용하는 IVIG의 이용에 기인하는 경우, 또는 음성 CMV 혈액 PCR을 이용하는 6개월 미만의 환자에서 IgG의 모계 전달에 기인하는 양성 혈청학, 또는 타액 또는 소변으로부터 수행된 다른 진단 연구의 경우, 필요하지 않다.
- [0260] 환자들은 임상적으로 적절한 용량 및 스케줄로 +1로부터 진균 예방을 받을 것이다. 예방은 치료적 레벨로 타겟팅하는 외래환자용 환경에 방출되기 이전에 초기 카스포핀진, 이어서 보리코나졸로의 전이를 포함할 것이다.
- [0261] 환자들에게는 후술하는 스케줄에 따라 일반적인 면역예방으로서 IVIG가 투여될 것이다:
- [0262] -15일 내지 이식 후 +55일: 2주 마다
- [0263] 이식 후 +55일 후: 혈청 IgG 레벨을 q2-3주 모니터링하고 IVIG를 보충하여 750 mg/dL 넘게 IgG를 유지한다. IgG 보충은, IgA 레벨이 정상으로 될 때까지 및 CD4 T-세포 계수가 200/uL를 넘을 때까지 계속될 것이다.
- [0264] 환자들은 레보플록사신 또는 적절한 대체물을 이용하여 임상적으로 적합한 용량 및 스케줄로 의사의 판단에 따라 시작하여 이식할 때까지 박테리아 예방을 받을 것이다. 이는 호중성 백혈구 감소성 발열 시 광범위 항생제의 개시시에 시작될 것이다.
- [0265] 환자들은 알렘투주맙 후로부터 시작하여 추가로 임상 지표에 따라 CMV PCR을 이용하여 매주 모니터링될 것이다. 치료는 확인된 양성 정량 PCR의 임의의 값 및/또는 문서로 기록된 CMV 질병을 보유하는 환자에서 개시될 것이다. 일차 라인 치료법은 14일 동안, 또는 CMV PCR이 음성이거나 또는 허용 가능한 레벨로 감소되거나, 또는 환자의 임상 징후가 해결될 때까지(어느 쪽이나 더 긴 쪽) 12시간 마다 5mg/kg/투여 IV의 간사이클로비르로 구성될 것이다. 유지 요법은 14일 동안, 또는 환자가 현저히 면역억제된 상태를 유지하는 경우, 더 길게 매일 5mg/kg/투여 IV의 간사이클로비르로 구성될 것이다. 10-14일 후 환자에서 임상적 개선이 없거나, 또는 PCR 역가가 높거나 증가된 상태로 유지되는 경우, 간사이클로비르 내성 및 제2 라인 치료법이 고려되어야 한다. 환자들은 골수억제의 부작용 및 신기능장애에 대해 면밀하게 모니터링되어야 한다. 포스카르네트 또는 시도포비르는 이식 전 또는 임상 지표에 따라 사용될 수 있다.
- [0266] 새로운 발열( $\geq 38.5^{\circ}\text{C} \times 1$  또는  $\geq 38^{\circ}\text{C} \times 2$  [2시간 이내에 측정]의 온도로서 정의됨)이 있는 환자는 철저한

신체검사를 수행하여야 하고, 모든 중심 카테터 포트로부터 혈액 배양물을 획득하여야 한다. 추가의 테스트는 임상 지표에 따라 수행되지만, 흉부 X-선 검사 또는 다른 영상화 연구, 소변 배양, 목구멍 또는 구강 배양, 바이러스 연구(비인두 면봉 검사), 및 분자 연구(CMV, 아데노바이러스, BK 바이러스 등)를 포함할 수 있다. 혈액 배양은 발열이 계속되면 24시간 마다 또는 임상적 변화가 있으면 더 자주 반복될 것이다. 경험적인 광범위 항생제는 배양물을 획득한 직후 개시될 것이다. 제1 단계 항생제는 6시간 마다 피레라실린-타조박탐 75mg/kg/투여 (페니실린으로 3000 mg 최대 용량) IV 및 6-8시간 마다 반코마이신 15mg/kg/투여 IV를 포함할 것이다. 반코마이신 최저 레벨은 8-12 mg/L을 목표로 자주 모니터링될 것이다. 적절한 대체물이 페니실린 또는 반코마이신에 알레르기가 있는 환자를 위해 사용될 수 있다. 항생제는 임상적 반응 및 박테리아 병원체의 동정에 기초하여 조정될 것이다. 경험적인 항진균 요법(몰트 커버리지 포함)은 3일 초과 동안 발열이 지속되는 환자에서 고려될 것이다. 항생제는 발열이 해소되고 최소 3일 동안 ANC가 >500이 될 때까지 계속될 것이다.

[0267] *VOD의 예방 및 관리*

[0268] 환자들에게는 정맥폐쇄병(VOD)의 예방을 위해 저용량의 헤파린이 투여될 것이다. 이는 -9일부터 +28일 또는 퇴원까지 100 유닛/kg/24시간의 연속 주입으로서 이루어질 것이다. 우르소디올은, 가능한 VOD가 고빌리루빈혈증, 고통스러운 간 비대, 복수, 유체 잔류가 있는 환자에서 의심될 것이기 때문에, 베이스라인에 가깝게 투여될 것이다. 일반적인 치료 조치는 근접 모니터링 및 유체 불균형의 교정을 포함할 것이다. 적절한 용량의 루프 이뇨제는 필요에 따라 Q12-6h를 증강시킨다. 심한 VOD는 데피브로타이드로 치료될 수 있다.

[0269] 이식 및 이식 장애의 관리의 평가: 정의(IBMTR 임상 리서치 전문가를 위한 매뉴얼 2003에 따름): 호중구 이식 - 다른 날에 테스트된 연속 3일 동안  $\geq 0.5 \times 10^3/\mu\text{l}$ 의 호중구; 혈소판 이식 - 이전 7일 동안 혈소판 이식 없이  $\geq 20,000/\mu\text{l}$ 의 혈소판 계수; 공여자 세포 이식 - +28일에  $\geq 50\%$ 의 공여자 세포; 이식 장애 - 일차 장애는 최소 일주일 간격의 2개의 연구에서 +42일까지 호중구 이식(상기한 바와 같음)의 결핍 또는 +100일까지 말초 혈액 또는 골수내 <10%의 공여자 세포로 정의된다. 이차 장애는 이식이 이전에 달성된 후(상기 기준에 따라), 이식물의 상실로서 정의된다.

[0270] 대략 +41-44일까지 호중구 이식의 증거가 없는 환자에서, 키메리즘을 평가하기 위해 골수 흡인 및 생체 검사가 수행될 것이다. 이식 장애의 일반적인 평가는 키메리즘을 위한 골수 흡인 및 생체 검사, 세포유전학 등; 지표에 따라 다른 연구 이외에 CMV, EBV, 파르보바이러스, 및 HIV-6를 포함하는 미생물 연구(골수 및 혈액); 및 키메리즘을 위한 말초 혈액을 포함할 것이다.

[0271] 이식 장애/거부의 초기 치료는 성장 인자를 이용하는 지지 및 골수 면역억제 약물의 중단을 포함할 것이다. 후속 이식은 공여자 이식의 증거가 없거나 혈구감소증과 관련된 심각한 결과가 있는 환자에서 고려될 것이다. 보류된 공여자 UCB 액적의 주입이 적절할 수 있다.

[0272] **백터 투여**

[0273] AAVrh.10-hGALC 용량은 상기한 동물 효능 및 안전성 연구의 결과에 의존할 것이다. 마우스로부터 인간으로의 스케일업은 킬로그램 체중당 동일한 계승 카피(gc/kg)에 기초할 것이다. 약  $4 \times 10^{13}$  gc/kg의 최대 용량은 UCBT 1일 후에 투여될 것이다. 2개의 투여 집단, 즉 각각 n=4명의 환자의 집단에게는 0.25 × 상기 타겟 용량에서 출발하고, 이어서 타겟 용량이 사용될 것이다.

[0274] 임상 등급 백터는 GMP를 준수하는 클린룸 시설에 제조될 것이고, 및 표 3에 기재한 바와 같이 로트-릴리즈 테스트가 수행될 것이다. 상기 백터는 임상 연구의 지속 기간에 걸쳐 안정한지 여부를 확인하기 위해 (예를 들어, GALC 효소 활성을 분석함으로써) 모니터링될 것이다.

[0275] 상기 백터는 UBCT를 관리하기 위해 존재하는 중심선을 통해 완충처리된 등장성 염수 중의 필요한 용량의 푸시(1 ml/분)로서 투여될 것이다. 이는 10 ml 주입과 같을 것이다.

[0276] **후속 조사**

[0277] 개개의 환자 평가는 도 7에 나타내는 바와 같이 수행될 것이다. 추가의 환자 평가는 베이스라인 방문 후 약 3, 6, 9, 및 12개월에 수행될 것이다.

[0278] [표 7] 질병 관련 절차의 스케줄

절차	방문 1	투여 방문 <sup>1</sup>	방문 2 90 일	방문 3 182 일	방문 4 273 일	방문 5 365 일
PI/사전 동의	•					
이니셜 및 생년월일	•					
인구 통계학 정보	•					
병력/체계별 문진	•	•	•	•	•	•
포함제외기준	•					
가족력(일차친척)	•					
과거 임상연구	•					
약물	•	•	•	•	•	•
신체검사 및 신경학적 조사	•	•	•	•	•	•
생명 징후	•	•	•	•	•	•
뇌 MRI	•		•	•	•	•
척추 천자 /뇌척수액 단백질 및 예비 바이오마커	•		•	•	•	•

[0279]

신경 전도 속도	•		•	•	•	•
시력 및 청력 검사	•		•	•	•	•
체중, 신장, 및 머리 둘레	•		•	•	•	•
유전형 분석 및 효소 테스트	•					
조기 학습의 물렌 척도	•		•	•	•	•
면역/감염 연구를 위한 채혈	•	•	•	•	•	•
피바디 발달 운동 척도	•		•	•	•	•
임상 화학(혈액)	•	•	•	•	•	•
GALC 활성 (혈액 및 뇌척수액)	•	•	•	•	•	•
항-AAV 항체	•	•	•	•	•	•
항-AAV 효소-결합 면역스팟(ELISPOT)	•		•	•	•	•
PCR에 의한 혈액, 소변, 대변, 및 타액의 분석 연구	•	•				

[0280]

[0281] <sup>1</sup> AAVrh.10 벡터의 투여 후, 수집/평가는 1, 2, 4 및 8주에 수행될 것이다. 추가의 혈액은 2주 동안 매주 2회, 추가로 2주 동안 매주 1회, 및 안정하고 치료적인 경우, 다음 4개월 동안 매월 채혈될 것이다.

[0282] 방문 1 - 베이스라인 평가(PRE-UCBT)

- [0283] 하기 데이터는 모든 환자에 대해 베이스라인에서 수집된다.
- [0284] 1. 환자의 이니셜, 생년월일, 및 환자 고유 ID 번호.
- [0285] 2. 인구통계 정보.
- [0286] 3. 이전 진단, 질병, 약물, 절차, 및 수술을 포함하는 유의미한 병력.
- [0287] 4. 이전에 수행된 경우, 하기 임상 조사의 결과: 뇌 MRI, 신경 전도 연구, 및 크라베병의 진단을 위한 유전적 및/또는 생화학적 테스트. 베이스라인 테스트는, 상기 연구에의 참가에 동의한 부모/법정 후견인의 서명이 3개월 이내에 이루어진 경우, 유효하다.
- [0288] 5. 하기 조사는 베이스라인 방문 시 수행될 것이다: 뇌 MRI, 요추 천자, 신경 전도 연구, 및 시력 및 청력 검사.
- [0289] 6. 현재 복용하는 모든 약물 및 투여 빈도 목록.
- [0290] 7. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사.
- [0291] 8. 부모(들) 및/또는 법정 후견인은 환자의 가족력(일차 친척)에 관해 질문을 받을 것인데, 이는 임의의 다른 가족 구성원이 크라베병으로 진단받았거나, 또는 (진단되지 않았으나) 상기 질병의 임상적 징후 및 증상이 있는지를 확인하기 위한 것이다.
- [0292] 9. 물렌 조기 학습 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 결과.
- [0293] 10. 단백질 및 백혈구 계수뿐만 아니라 GALC 활성을 위한 베이스라인 뇌척수액(CSF) 수집. 나머지는 향후의 바이오 마커 평가를 위해 보관될 것이다.
- [0294] 11. 임상 화학 및 항AAV 항체 및 GALC 활성의 측정을 위한 베이스라인 혈액 수집.
- [0295] 12. AAVrh.10 및 GALC에 대한 T 세포 반응을 측정하기 위한 베이스라인 혈액 수집.
- [0296] 13. 백터 배출 분석을 위한 샘플(혈액, 대변, 소변 및 타액)의 베이스라인 수집.
- [0297] 신경발달 평가는 1일에 수행될 것이다. 의학/진단 테스트는 2일에 수행될 것이다.
- [0298] 1일. 신경발달 평가
  - [0299] 1. 병력 및 수반적 질병의 검토
- [0300] 2. 모든 현재의 약물 치료 및 투여 빈도의 목록
- [0301] 3. 청능사에 의한 청각 조사
- [0302] 4. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사
- [0303] 5. 조기 학습의 물렌 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 시행
- [0304] 2일. 의학 및 진단 테스트
  - [0305] 1. 뇌 MRI
  - [0306] 2. 요추 천자
  - [0307] 3. 신경 전도 속도 연구
  - [0308] 4. 채혈
  - [0309] 5. 소변, 대변, 및 타액 수집
- [0310] 3일. UCBT 평가 및 UCBT를 위한 준비. 백터는 UCBT에 대해 +1일에 주사될 것이다.
- [0311] 백터 투여 후 1, 2, 4, 및 8주에 샘플은 수집이 다음과 같이 수행될 것이다:
  - [0312] 1. 임상 화학, 항-AAV 중화 항체 검출, 백터 배출 분석, 및 GALC 활성을 위한 혈액 수집
  - [0313] 2. 백터 배출 분석을 위한 소변, 대변 및 타액의 수집

- [0314] 방문 2 (UCBT 및 AAVrh.10-hGALC 후 90 ± 5일)
- [0315] 방문은 이틀에 걸쳐 이루어질 것이며 하기를 포함한다:
- [0316] 1일. 신경발달 평가
- [0317] 1. 중간 병력 및 수반적 질병의 검토
- [0318] 2. 최종 방문 이래 현재 복용하는 모든 약물 및 투여 빈도 목록
- [0319] 3. 시력 및 청력 검사(청능사에 의함)
- [0320] 4. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사
- [0321] 5. 조기 학습의 플렌 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 시행
- [0322] 2일. 의료 및 진단 테스트
- [0323] 1. 뇌 MRI
- [0324] 2. 요추 천자
- [0325] 3. 신경 전도 연구
- [0326] 4. 혈액 샘플을 이용하는 임상 화학 분석
- [0327] 5. ELISPOT를 이용하는 항-AAV 및 항-GALC T 세포 반응을 위한 혈액 수집
- [0328] 방문 3 (180일 ± 1개월)
- [0329] 방문은 이틀에 걸쳐 이루어질 것이며 하기를 포함한다:
- [0330] 1일. 신경발달 평가
- [0331] 1. 중간 병력 및 수반적 질병의 검토
- [0332] 2. 최종 방문 이래 현재 복용하는 모든 약물 및 투여 빈도 목록
- [0333] 3. 시력 및 청력 검사(청능사에 의함)
- [0334] 4. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사.
- [0335] 5. 조기 학습의 플렌 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 시행.
- [0336] 2일. 의료 및 진단 테스트
- [0337] 1. 뇌 MRI
- [0338] 2. 요추 천자
- [0339] 3. 신경 전도 연구
- [0340] 4. 혈액 샘플을 이용하는 임상 화학 분석
- [0341] 5. ELISPOT를 이용하는 항-AAV 및 항-GALC T 세포 반응을 위한 혈액 수집
- [0342] 방문 4 (270일 ± 1개월)
- [0343] 방문은 이틀에 걸쳐 이루어질 것이며 하기를 포함한다:
- [0344] 1일. 신경발달 평가
- [0345] 1. 중간 병력 및 수반적 질병의 검토
- [0346] 2. 최종 방문 이래 현재 복용하는 모든 약물 및 투여 빈도 목록
- [0347] 3. 시력 및 청력 검사(청능사에 의함)
- [0348] 4. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사
- [0349] 5. 조기 학습의 플렌 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 시행

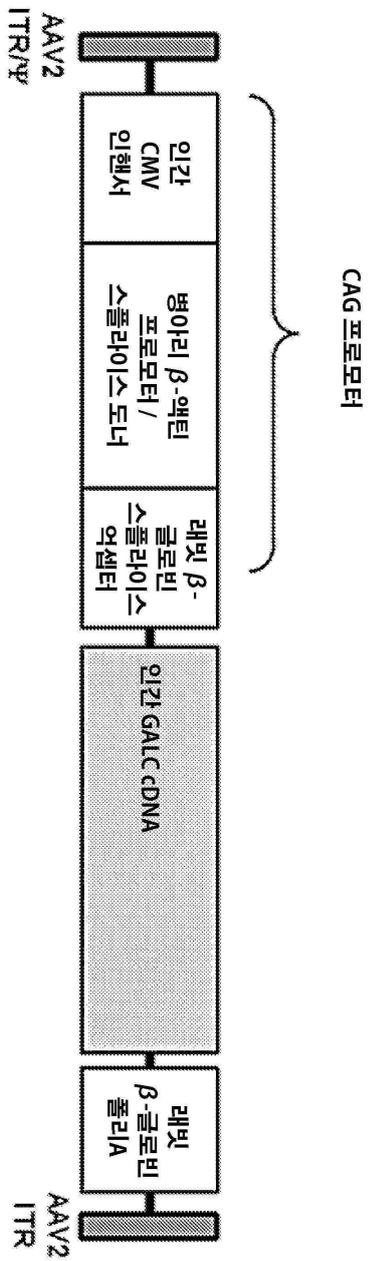
- [0350] 2일. 의료 및 진단 테스트
- [0351] 1. 뇌 MRI
- [0352] 2. 요추 천자
- [0353] 3. 신경 전도 연구
- [0354] 4. 혈액 샘플을 이용하는 임상 화학 분석
- [0355] 5. ELISPOT를 이용하는 항-AAV 및 항-GALC T 세포 반응을 위한 혈액 수집
- [0356] 5.5.5 방문 5 (360일 ± 1개월)
- [0357] 방문은 이틀에 걸쳐 이루어질 것이며 하기를 포함한다:
- [0358] 1일. 신경발달 평가
- [0359] 1. 중간 병력 및 수반적 질병의 검토
- [0360] 2. 최종 방문 이래 현재 복용하는 모든 약물 및 투여 빈도 목록
- [0361] 3. 시력 및 청력 검사(청능사에 의함)
- [0362] 4. 생명 징후(혈압, 맥박, 신장, 체중, 및 머리 둘레)를 포함하는 신체검사 및 신경학적 조사
- [0363] 5. 조기 학습의 물렌 척도 및 피바디 발달 운동 척도의 시행
- [0364] 2일. 의료 및 진단 테스트.
- [0365] 1. 뇌 MRI
- [0366] 2. 요추 천자
- [0367] 3. 신경 전도 연구
- [0368] 4. 혈액 샘플을 이용하는 임상 화학 분석
- [0369] 5. ELISPOT를 이용하는 항-AAV 및 항-GALC T 세포 반응을 위한 혈액 수집.
- [0370] **평가 방법의 상세**
- [0371] *신체검사 및 신경학적 조사.* 완전한 신체검사(일반적인 외관, 피부, 머리, 눈, 귀, 코, 목, 림프절, 심장, 폐, 복부, 말단/관절, 및 엉덩이를 포함함)는 베이스라인 단계 및 표 7에 상세히 기재된 시점에서 1회 수행될 것이다. 신장 또는 길이(cm, 표준 측정 보드 위에 누운 상태로 측정), 체중(kg, 신발 또는 젖은 상태의 기저귀 없이 측정하고, 및 가장 가벼운 옷은 가능) 및 머리 둘레(cm, 표준 후두골 전면)가 측정될 것이다. 이들은 자연사 데이터에 대해 비교되어 가능한 부작용 및 치료 효능을 평가할 것이다.
- [0372] 연장된 신경학적 조사는 근육 탄력 및 반사신경 및 신경발달 기능의 평가를 포함할 것이다.
- [0373] *생명 징후.* 수축기 및 확장기 혈압(mm Hg) 및 심장 박동(박동/분)이 측정될 것이다.
- [0374] *뇌척수액 바이오마커.* 증가된 CSF 단백질 수준은 예비 징후 크라베병 환자에서 증가된 CSF 단백질을 나타내는 요추 천자를 시행한 25명의 영아들 중 23명(92%)의 비율로 검출되어 왔다. 본 실시예에서, CSF는 미엘린 완전성의 바이오마커를 평가하기 위해 수집될 것이다. 또한, 일상적인 CSF 분석은 세포 계수, 단백질 측정, 글루코오스, 알부민, 및 IgG를 포함하여 수행될 것이다. 혈액-뇌 장벽의 무손상은 CSF IgG 농도와 혈청 알부민 농도 사이의 관련성을 평가함으로써 결정된다. 알부민 지수(AQ)는 혈액-뇌 장벽의 투과성을 평가하기 위해 추정될 것이다(AQ=CSF 알부민/혈청 알부민 x 100). 척추강내 IgG 생성은 CSF IgG/혈청 알부민 비율을 측정함으로써 계산되는데, 0.27 mg/dl 미만이어야 한다. IgG 지수는 혈청 IgG 및 CSF 알부민의 생성물에 대한 CSF IgG 및 혈청 알부민의 생성물의 비율이다. IgG 지수의 증가(>0.70 mg/dl)는 CNS 내에서 증가된 면역글로불린 합성을 반영하고, CNS 내에서 감염성 및 염증성 질환을 반영하기 위해 고려된다. 또한 CSF내 GALC 활성도 평가될 것이다.
- [0375] *박터 배출.* 박터 투여 후 혈액, 소변, 대변, 및 타액 내 박터의 존재는 qPCR에 의해 평가될 것이다.
- [0376] *안전성 랩.* 수집된 혈액에 대한 임상 화학 분석은 임의의 잠재적인 악영향을 모니터링하기 위해 일상적으로 수행될 것이다. 간 효소(아스파르테이트 트랜스아미나아제, 알라닌 트랜스아미나아제)가 GALC 과발현 및/또는 세

포독선 T 세포 반응에 기인하는 잠재적인 간 독성에 대해 모니터링될 것이다.

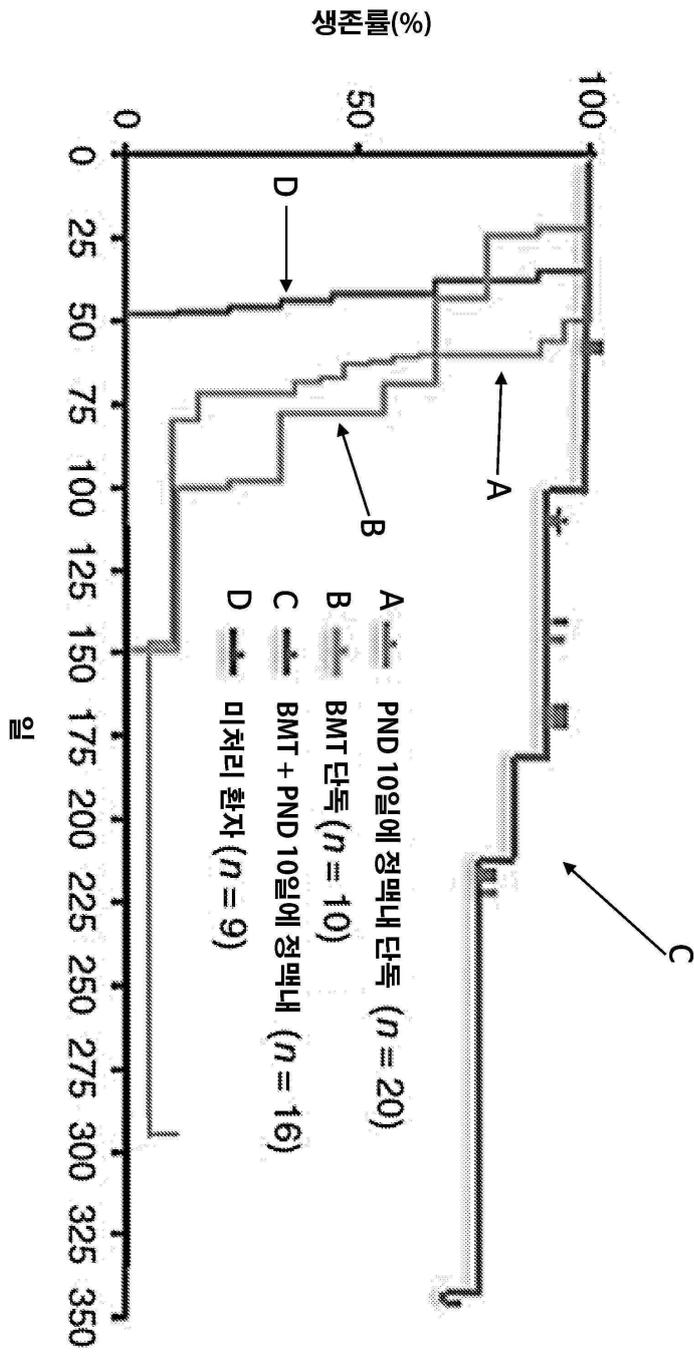
- [0377] **면역 반응.** 전혈은 AAVrh.10 및 GALC에 대한 T 세포 반응을 측정하기 위해 베이스라인, 및 3개월마다 수집될 것이다. 혈장 또는 혈청은 주사 후 1, 2, 4, 및 8주, 및 3, 6, 9, 및 12개월에 AAVrh.10에 대한 항체의 생성을 모니터링하기 위해 분석될 것이다.
- [0378] **뇌 MRI.** 각각의 환자는 MRI(즉, 뇌의 확산 텐서 영상)를 촬영할 것이다. 뇌의 MRI는 현재 크라베병 환자에서 미엘린병을 평가하기 위한 최상의 구조적인 대리 지표를 제공한다(Escolar *et al.*, *Am J Neuroradiol.* 30(5):1017-21, 2009). 대조군 영아들 및 크라베병 환자의 뇌 MRI는, 혈연관계가 없는 UCBT가 시행된 크라베병 환자에서 질병의 진행을 모니터링하기 위해 특이적으로 개발된 수정 루에스 스코어링 시스템을 이용하여 경험이 풍부한 신경방사선 학자에 의해 시각적으로 스코어링될 것이다 (Provenzale *et al.*, *Ann N Y Acad Sci.* 1064:220-9, 2005, Provenzale *et al.*, *Am J Roentgenol.* 192(1):59-65, 2009). 최근, 확산 텐서 영상은 성장하는 뇌에서 백색 물질 병리학을 조사하기 위해, 및 탈미엘린화 상태의 아기들에서 축삭돌기 구조 및 미엘린화 둘 다를 평가하기 위한 선택 양상이 되었다(Escolar *et al.*, *Am J Neuroradiol.* 30(5):1017-21, 2009, Gupta *et al.*, *Neuroimage Clin.* 26;7:792-8, 2014). 신경다발 추적방법과 함께 확산 텐서 영상을 이용하면, 연령- 및 성별-매칭된 대조군과 비교하는 경우 표준편차 내에서 미엘린 파괴가 정량될 수 있고, 측정될 수 있다.
- [0379] **신경 전도 속도 연구(감각 신경 및 운동 신경).** 크라베병을 앓고 있는 아기들은 질병 진행의 초기에 말초신경병증, 및 질병이 진행됨에 따라 악화된 신경 전도 속도를 보유하여(Escolar *et al.*, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005; Escolar *et al.*, *Pediatrics.* 118(3): e879-89, 2006), 결과적으로 근육이 약해진다. 크라베병에 대해 폭넓은 경험을 가진 신경생리학자들이 이 테스트를 수행할 것이다.
- [0380] **신경 전도 속도(NCV), 진폭(AMP), 및 말단 레이턴시(DL) 연구는 통상적인 기법으로 수행될 것이다.** 운동 신경의 경우, NCV, AMP, 및 DL이 정중 신경에서 및 비골 신경에서 측정될 것이다. 이들 신경 중 어느 하나에서 관련없는 신호가 베이스라인에서 생성될 수 있는 경우, 척골 신경, 경골 신경, 또는 둘 다에 대해 베이스라인에서 평가될 것이다. 팔 및 다리 중 하나에서 한 신경이 반복된 평가를 위한 가용한 반응의 기초로서 선택될 것이다. 감각 신경의 경우, DL, NCV, 및 AMP가 정중 신경 및 비골 신경에서 측정될 것이다.
- [0381] **신경발달 기능.** 신경발달 평가 및 크라베병의 수직적인 연구에서 이들의 용도는 광범위하게 공개되어 있다 (Escolar *et al.*, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005; Escolar *et al.*, *Pediatrics.* 118(3):e879-89, 2006; Escolar *et al.*, *Lysosomal Storage Dis.* 6(3):71-9, 2006; Martin *et al.*, *Acta Paediatr Suppl.* 97(457):69-75, 2007). 특정 평가 도구는 크라베병 환자 대 정상 대조군에서의 인지, 언어, 및 운동 발달의 표준화된 측정치를 반영하기 위해 선택되었다.
- [0382] **성장 속도.** 신장, 체중, 및 머리 둘레는 성장 속도를 평가하기 위해 측정될 것이다. 체질량 지수는 체중 및 신장에 기초하여 계산될 것이다.
- [0383] **조기 학습의 물렌 척도.** 물렌 척도는 나이가 68개월 이하인 유아 및 영아에 대해 시행할 수 있다. T-스코어, 백분위 점수, 및 연령-균등 스코어가 4개의 척도(시각적 수용, 소근육 운동, 표현 언어, 및 수용 언어)에 대해 개별적으로 계산될 수 있다. 어린 아이의 비언어적 능력 레벨의 평가는 전체적인 발달을 평가하기 위해 중요하다. 영아 및 유아의 임상 평가에서 훈련된 계량심리학자가 이 테스트를 시행할 것이다. 연령-균등 스코어는 시간에 따라 발달을 추적하고 테스트를 비교하기 위해 사용될 것이다.
- [0384] **피바디 발달 운동 척도.** 피바디 척도는 영아의 질병이 진행됨에 따라 또는 회복 중에 운동 패턴의 변화에 대한 민감성을 증가시키는 몇몇 아이템에 대한 정량적인 및 정성적인 능력 둘 다를 포착한다. 도 4는 상기한 도구를 이용하여 혈연관계가 아닌 UCBT로 처리된 개별적인 환자의 궤적의 예를 나타낸다(Escolar *et al.*, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005). 도 4는 혈연관계가 아닌 제대혈로 이식되고, 상기한 도구로 테스트된 개별적인 환자의 궤적의 예를 나타낸다. 착색된 라인은 징후가 없거나 최소의 징후를 나타내는 환자의 발달을 나타낸다. 흑색 라인은 심각한 징후 후에 이식된 환자를 나타낸다. 증상을 나타내는 환자의 궤적은 처리되지 않은 환자의 궤적과 유사하다.
- [0385] **개시의 원칙이 적용될 수 있는 다수의 가능한 실시양태의 관점에서, 예시된 실시양태는 단지 본 발명의 예이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아님을 인식하여야 한다.** 오히려, 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구의 범위에 의해 한정된다. 따라서 우리는 이들 특허청구범위의 범위 및 사상 내의 모든 것을 우리의 발명으로 주장한다.

도면

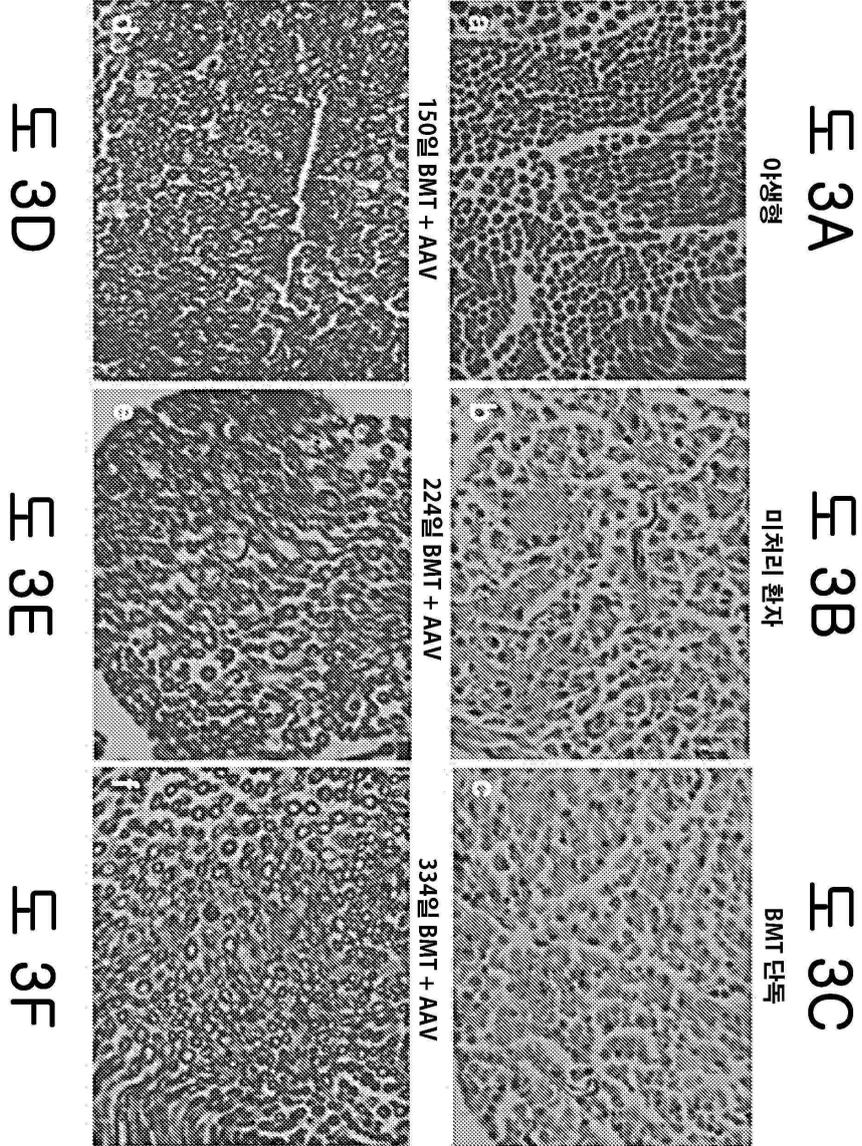
도면1



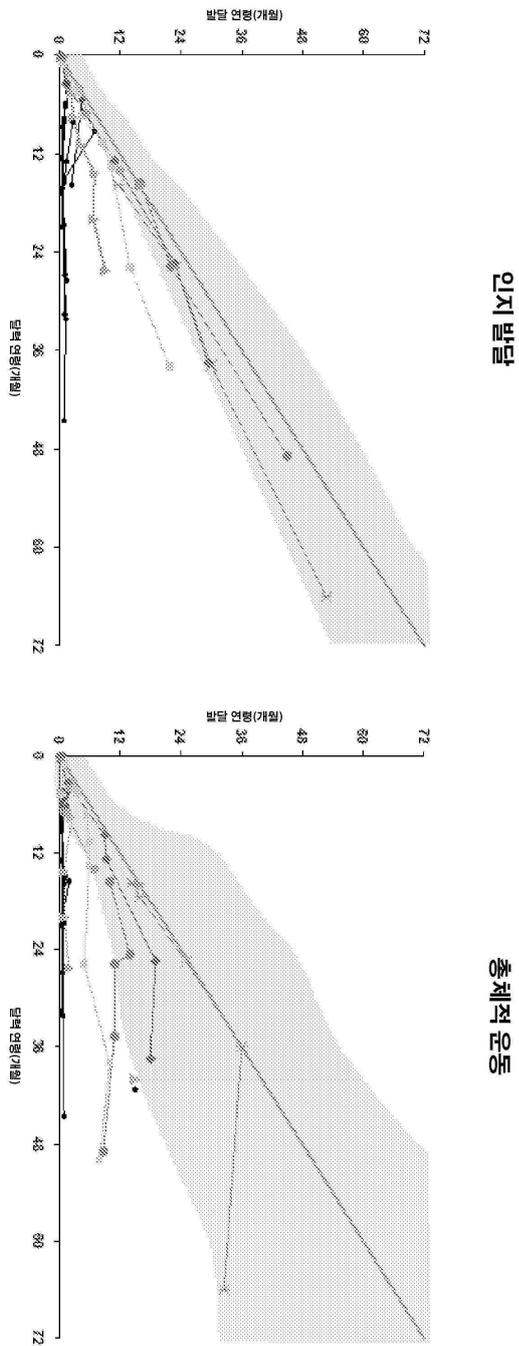
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Pittsburgh

<120> TREATMENT OF KRABBE DISEASE WITH UMBILICAL CORD BLOOD TRANSPLANTION  
(UCBT) AND INCREASED GALACTOCEREBROSIDASE (GALC) EXPRESSION

<130> 8123-98210-02

<150> 62/448,433

<151> 2017-01-20  
 <160> 4  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 3897  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> CDS  
 <222> (108)..(2162)  
 <400> 1

actcaaatg gcggcggcgg cgtcagcatc agcggcctcc tgcccgtatc tatcgtggcg 60

gcgacgggac ccgcctccct gggcgccgga gtcatgtgac ccacaca atg gct gag 116  
 Met Ala Glu  
 1

tgg cta ctc tcg gct tcc tgg caa cgc cga gcg aaa gct atg act gcg 164  
 Trp Leu Leu Ser Ala Ser Trp Gln Arg Arg Ala Lys Ala Met Thr Ala  
 5 10 15

gcc gcg ggt tcg gcg ggc cgc gcc gcg gtg ccc ttg ctg ctg tgt gcg 212

Ala Ala Gly Ser Ala Gly Arg Ala Ala Val Pro Leu Leu Leu Cys Ala  
 20 25 30 35

ctg ctg gcg ccc ggc ggc gcg tac gtg ctc gac gac tcc gac ggg ctg 260  
 Leu Leu Ala Pro Gly Gly Ala Tyr Val Leu Asp Asp Ser Asp Gly Leu  
 40 45 50

ggc cgg gag ttc gac ggc atc ggc gcg gtc agc ggc ggc ggg gca acc 308  
 Gly Arg Glu Phe Asp Gly Ile Gly Ala Val Ser Gly Gly Gly Ala Thr  
 55 60 65

tcc cga ctt cta gta aat tac cca gag ccc tat cgt tct cag ata ttg 356  
 Ser Arg Leu Leu Val Asn Tyr Pro Glu Pro Tyr Arg Ser Gln Ile Leu  
 70 75 80

gat tat ctc ttt aag ccg aat ttt ggt gcc tct ttg cat att tta aaa 404  
 Asp Tyr Leu Phe Lys Pro Asn Phe Gly Ala Ser Leu His Ile Leu Lys

85	90	95	
gtg gaa ata ggt ggt gat ggg cag aca aca gac ggc act gag ccc tcc			452
Val Glu Ile Gly Gly Asp Gly Gln Thr Thr Asp Gly Thr Glu Pro Ser			
100	105	110	115
cac atg cat tat gca cta gat gag aat tat ttc cga gga tac gag tgg			500
His Met His Tyr Ala Leu Asp Glu Asn Tyr Phe Arg Gly Tyr Glu Trp			
	120	125	130
tgg ttg atg aaa gaa gct aag aag agg aat ccc aat att aca ctc att			548
Trp Leu Met Lys Glu Ala Lys Lys Arg Asn Pro Asn Ile Thr Leu Ile			
	135	140	145
ggg ttg cca tgg tca ttc cct gga tgg ctg gga aaa ggt ttc gac tgg			596
Gly Leu Pro Trp Ser Phe Pro Gly Trp Leu Gly Lys Gly Phe Asp Trp			
150	155	160	
cct tat gtc aat ctt cag ctg act gcc tat tat gtc gtg acc tgg att			644
Pro Tyr Val Asn Leu Gln Leu Thr Ala Tyr Tyr Val Val Thr Trp Ile			
	165	170	175
gtg ggc gcc aag cgt tac cat gat ttg gac att gat tat att gga att			692
Val Gly Ala Lys Arg Tyr His Asp Leu Asp Ile Asp Tyr Ile Gly Ile			
180	185	190	195
tgg aat gag agg tca tat aat gcc aat tat att aag ata tta aga aaa			740
Trp Asn Glu Arg Ser Tyr Asn Ala Asn Tyr Ile Lys Ile Leu Arg Lys			
	200	205	210
atg ctg aat tat caa ggt ctc cag cga gtg aaa atc ata gca agt gat			788
Met Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Gln Arg Val Lys Ile Ile Ala Ser Asp			
	215	220	225
aat ctc tgg gag tcc atc tct gca tcc atg ctc ctt gat gcc gaa ctc			836
Asn Leu Trp Glu Ser Ile Ser Ala Ser Met Leu Leu Asp Ala Glu Leu			
230	235	240	
ttc aag gtg gtt gat gtt ata ggg gct cat tat cct gga acc cat tca			884

Phe Lys Val Val Asp Val Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly Thr His Ser  
 245 250 255

gca aaa gat gca aag ttg act ggg aag aag ctt tgg tct tct gaa gac 932

Ala Lys Asp Ala Lys Leu Thr Gly Lys Lys Leu Trp Ser Ser Glu Asp  
 260 265 270 275

ttt agc act tta aat agt gac atg ggt gca ggc tgc tgg ggt cgc att 980

Phe Ser Thr Leu Asn Ser Asp Met Gly Ala Gly Cys Trp Gly Arg Ile

280 285 290

tta aat cag aat tat atc aat ggc tat atg act tcc aca atc gca tgg 1028

Leu Asn Gln Asn Tyr Ile Asn Gly Tyr Met Thr Ser Thr Ile Ala Trp  
 295 300 305

aat tta gtg gct agt tac tat gaa cag ttg cct tat ggg aga tgc ggg 1076

Asn Leu Val Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Leu Pro Tyr Gly Arg Cys Gly  
 310 315 320

ttg atg acg gcc cag gag cca tgg agt ggg cac tac gtg gta gaa tct 1124

Leu Met Thr Ala Gln Glu Pro Trp Ser Gly His Tyr Val Val Glu Ser  
 325 330 335

cct gtc tgg gta tca gct cat acc act cag ttt act caa cct ggc tgg 1172

Pro Val Trp Val Ser Ala His Thr Thr Gln Phe Thr Gln Pro Gly Trp  
 340 345 350 355

tat tac ctg aag aca gtt ggc cat tta gag aaa gga gga agc tac gta 1220

Tyr Tyr Leu Lys Thr Val Gly His Leu Glu Lys Gly Gly Ser Tyr Val  
 360 365 370

gct ctg act gat ggc tta ggg aac ctc acc atc atc att gaa acc atg 1268

Ala Leu Thr Asp Gly Leu Gly Asn Leu Thr Ile Ile Ile Glu Thr Met  
 375 380 385

agt cat aaa cat tct aag tgc ata cgg cca ttt ctt cct tat ttc aat 1316

Ser His Lys His Ser Lys Cys Ile Arg Pro Phe Leu Pro Tyr Phe Asn

390 395 400

gtg tca caa caa ttt gcc acc ttt gtt ctt aag gga tct ttt agt gaa 1364

Val Ser Gln Gln Phe Ala Thr Phe Val Leu Lys Gly Ser Phe Ser Glu

405                      410                      415  
 ata cca gag cta cag gta tgg tat acc aaa ctt gga aaa aca tcc gaa      1412  
 Ile Pro Glu Leu Gln Val Trp Tyr Thr Lys Leu Gly Lys Thr Ser Glu  
 420                      425                      430                      435  
  
 aga ttt ctt ttt aag cag ctg gat tct cta tgg ctc ctt gac agc gat      1460  
 Arg Phe Leu Phe Lys Gln Leu Asp Ser Leu Trp Leu Leu Asp Ser Asp  
                                  440                      445                      450  
 ggc agt ttc aca ctg agc ctg cat gaa gat gag ctg ttc aca ctc acc      1508  
 Gly Ser Phe Thr Leu Ser Leu His Glu Asp Glu Leu Phe Thr Leu Thr  
                                  455                      460                      465  
 act ctc acc act ggt cgc aaa ggc agc tac ccg ctt cct cca aaa tcc      1556  
  
 Thr Leu Thr Thr Gly Arg Lys Gly Ser Tyr Pro Leu Pro Pro Lys Ser  
                                  470                      475                      480  
 cag ccc ttc cca agt acc tat aag gat gat ttc aat gtt gat tac cca      1604  
 Gln Pro Phe Pro Ser Thr Tyr Lys Asp Asp Phe Asn Val Asp Tyr Pro  
                                  485                      490                      495  
 ttt ttt agt gaa gct cca aac ttt gct gat caa act ggt gta ttt gaa      1652  
 Phe Phe Ser Glu Ala Pro Asn Phe Ala Asp Gln Thr Gly Val Phe Glu  
  
 500                      505                      510                      515  
 tat ttt aca aat att gaa gac cct ggc gag cat cac ttc acg cta cgc      1700  
 Tyr Phe Thr Asn Ile Glu Asp Pro Gly Glu His His Phe Thr Leu Arg  
                                  520                      525                      530  
 caa gtt ctc aac cag aga ccc att acg tgg gct gcc gat gca tcc aac      1748  
 Gln Val Leu Asn Gln Arg Pro Ile Thr Trp Ala Ala Asp Ala Ser Asn  
                                  535                      540                      545  
  
 aca atc agt att ata gga gac tac aac tgg acc aat ctg act ata aag      1796  
 Thr Ile Ser Ile Ile Gly Asp Tyr Asn Trp Thr Asn Leu Thr Ile Lys  
                                  550                      555                      560  
 tgt gat gta tac ata gag acc cct gac aca gga ggt gtg ttc att gca      1844  
 Cys Asp Val Tyr Ile Glu Thr Pro Asp Thr Gly Gly Val Phe Ile Ala  
                                  565                      570                      575

gga aga gta aat aaa ggt ggt att ttg att aga agt gcc aga gga att 1892

Gly Arg Val Asn Lys Gly Gly Ile Leu Ile Arg Ser Ala Arg Gly Ile  
 580 585 590 595

ttc ttc tgg att ttt gca aat gga tct tac agg gtt aca ggt gat tta 1940  
 Phe Phe Trp Ile Phe Ala Asn Gly Ser Tyr Arg Val Thr Gly Asp Leu  
 600 605 610

gct gga tgg att ata tat gct tta gga cgt gtt gaa gtt aca gca aaa 1988  
 Ala Gly Trp Ile Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Val Glu Val Thr Ala Lys  
 615 620 625

aaa tgg tat aca ctc acg tta act att aag ggt cat ttc acc tct ggc 2036  
 Lys Trp Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Ile Lys Gly His Phe Thr Ser Gly  
 630 635 640

atg ctg aat gac aag tct ctg tgg aca gac atc cct gtg aat ttt cca 2084  
 Met Leu Asn Asp Lys Ser Leu Trp Thr Asp Ile Pro Val Asn Phe Pro  
 645 650 655

aag aat ggc tgg gct gca att gga act cac tcc ttt gaa ttt gca cag 2132  
 Lys Asn Gly Trp Ala Ala Ile Gly Thr His Ser Phe Glu Phe Ala Gln  
 660 665 670 675

ttt gac aac ttt ctt gtg gaa gcc aca cgc taataacttaa caggcatca 2182  
 Phe Asp Asn Phe Leu Val Glu Ala Thr Arg  
 680 685

tagaatactc tggattttct tcccttcttt ttggttttgg ttcagagcca attcttgttt 2242

cattggaaca gtatatgagg cttttgagac taaaaataat gaagagtaa aggggagaga 2302  
 aatttatatt taatttacc tgtggaagat ttattagaa ttaattccaa ggggaaaact 2362  
 ggtgaatctt taacattacc tgggtgtgttc cctaacattc aaactgtgca ttggccatac 2422  
 ccttaggagt ggittgagta gtacagacct cgaagccttg ctgctaacac tgaggtagct 2482  
 ctcttcactt tatttgcaag cggctctgta gatggcagta acttgatcat cactgagatg 2542  
 tatttatgca tgctgaccgt gtgtccaagt gagccagtgt cttcatcaca agatgatgct 2602  
 gccataatag aaagctgaag aacactagaa gtagcttttt gaaaaccact tcaacctgtt 2662

atgctttatg ctctaaaaag tattttttta ttttcctttt taagatgata cttttgaaat 2722  
gcaggatag atgagtgga tgattttaaa aatgcctctt taataaacta cctctaacac 2782  
tatttctgca gtaatagata ttagcagatt aatgggtta tttgcattat ttaatTTTT 2842  
tgattccaag ttttggctt gtaaccacta taactctctg tgaacgtttt tccaggtggc 2902  
tggaagaagg aagaaaacct gatatagcca atgctgttgt agtcgtttcc tcagcctcat 2962  
ctcactgtgc tgtggctctg cctccatgt gcactggtaa cagactcaca cagctgatga 3022  
atgcttttct ctcttatgt gtggaaggag gggagcactt agacatttgc taactcccag 3082

aattggatca tctcctaaga tgtacttact ttttaaagtc caaatatgtt tatattttaa 3142  
tatactgag cggtttcatc atgttgtatg atttatacta agcattaatg tggctctatg 3202  
tagcaaatca gttattcatg taggtaaagt aaactagaa ttatttataa gaattactca 3262  
ttgaactaat tctactattt aggaatttgt aagagtctaa cataggctta gctacagtga 3322  
agttttgcat tgcttttgaa gacaagaaga taagtctag aataaataag attacagaga 3382  
aaatTTTTg ttaaaaccaa gtgatttcca gctgatgat ctaatatttt ttaaaacgaa 3442  
cattatagag gtgtaattta tttacaataa aatgttccca ctttaaatat acaattcagt 3502

gagttttgat aaattgatat acccatgtaa ccaacactcc agtcaagctt cagaatattt 3562  
ccatcacccc agaaggttct cttgtatacc tgctcagtea gttcctttca ctcccaattg 3622  
ttggcagcca ttgatagtaa ttctatcact ataggttagt tttctttgtt ccagaacatc 3682  
atgaaagcgg cgtcatgtac tgtgtattct tatgaatggg ttccttccat cagcataatg 3742  
atTTGagatt tgtccatgtt gtgtgattca gtggtttgtt ccttcttatt tctgaagagt 3802  
tttccattgt atgaatatac cacaatttgt ttctcicca ccagtttctg atactacaat 3862  
taaaactgtc tacatttaca aaaaaaaaaa aaaa 3897

<210> 2

<211> 685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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



Ala Ser Asn Thr Ile Ser Ile Ile Gly Asp Tyr Asn Trp Thr Asn Leu  
 545                      550                      555                      560

Thr Ile Lys Cys Asp Val Tyr Ile Glu Thr Pro Asp Thr Gly Gly Val

565                      570                      575

Phe Ile Ala Gly Arg Val Asn Lys Gly Gly Ile Leu Ile Arg Ser Ala

580                      585                      590

Arg Gly Ile Phe Phe Trp Ile Phe Ala Asn Gly Ser Tyr Arg Val Thr

595                      600                      605

Gly Asp Leu Ala Gly Trp Ile Ile Tyr Ala Leu Gly Arg Val Glu Val

610                      615                      620

Thr Ala Lys Lys Trp Tyr Thr Leu Thr Leu Thr Ile Lys Gly His Phe

625                      630                      635                      640

Thr Ser Gly Met Leu Asn Asp Lys Ser Leu Trp Thr Asp Ile Pro Val

645                      650                      655

Asn Phe Pro Lys Asn Gly Trp Ala Ala Ile Gly Thr His Ser Phe Glu

660                      665                      670

Phe Ala Gln Phe Asp Asn Phe Leu Val Glu Ala Thr Arg

675                      680                      685

<210> 3

<211> 2217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> AAV serotype rh.10 capsid

<220><221> CDS

<222> (1)..(2217)

<400> 3

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc tct 48

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

1                      5                      10                      15

gag ggc att cgc gag tgg tgg gac ttg aaa cct gga gcc cgc aaa ccc 96

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

20	25	30	
aaa gcc aac cag caa aag cag gac gac ggc cgg ggt ctg gtg ctt cct			144
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35	40	45	
ggc tac aag tac ctc gga ccc ttc aac gga ctc gac aag ggg gag ccc			192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
gtc aac gcg gcg gac gca gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac			240
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80
cag cag ctc aaa gcg ggt gac aat ccg tac ctg cgg tat aac cac gcc			288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
gac gcc gag ttt cag gag cgt ctg caa gaa gat acg tct ttt ggg ggc			336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aag aag cgg gtt ctc gaa cct			384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro			
115	120	125	
ctc ggt ctg gtt gag gaa ggc gct aag acg gct cct gga aag aag aga			432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
ccg gta gag cca tca ccc cag cgt tct cca gac tcc tct acg ggc atc			480
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile			
145	150	155	160
ggc aag aaa ggc cag cag ccc gcg aaa aag aga ctc aac ttt ggg cag			528
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln			
165	170	175	
act ggc gac tca gag tca gtg ccc gac cct caa cca atc gga gaa ccc			576

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
 180 185 190  
 ccc gca ggc ccc tct ggt ctg gga tct ggt aca atg gct gca ggc ggt 624  
 Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205  
 ggc gct cca atg gca gac aat aac gaa ggc gcc gac gga gtg ggt agt 672  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
 210 215 220  
 tcc tca gga aat tgg cat tgc gat tcc aca tgg ctg ggc gac aga gtc 720  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225 230 235 240  
 atc acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctc ccc acc tac aac aac cac 768  
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
 245 250 255  
 ctc tac aag caa atc tcc aac ggg act tcg gga gga agc acc aac gac 816  
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp  
 260 265 270  
 aac acc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttt aac 864  
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn  
 275 280 285  
 aga ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc aac 912  
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 aac aac tgg gga ttc cgg ccc aag aga ctc aac ttc aag ctc ttc aac 960  
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn  
 305 310 315 320  
 atc cag gtc aag gag gtc acg cag aat gaa ggc acc aag acc atc gcc 1008  
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala  
 325 330 335  
 aat aac ctt acc agc acg att cag gtc ttt acg gac tcg gaa tac cag 1056  
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln

340	345	350	
ctc ccg tac gtc ctc ggc tct gcg cac cag ggc tgc ctg cct ccg ttc			1104
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe			
355	360	365	
ccg gcg gac gtc ttc atg att cct cag tac ggg tac ctg act ctg aac			1152
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn			
370	375	380	
aat ggc agt cag gcc gtg ggc cgt tcc tcc ttc tac tgc ctg gag tac			1200
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr			
385	390	395	400
ttt cct tct caa atg ctg aga acg ggc aac aac ttt gag ttc agc tac			1248
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr			
405	410	415	
cag ttt gag gac gtg cct ttt cac agc agc tac gcg cac agc caa agc			1296
Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser			
420	425	430	
ctg gac cgg ctg atg aac ccc ctc atc gac cag tac ctg tac tac ctg			1344
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu			
435	440	445	
tct cgg act cag tcc acg gga ggt acc gca gga act cag cag ttg cta			1392
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu			
450	455	460	
ttt tct cag gcc ggg cct aat aac atg tcg gct cag gcc aaa aac tgg			1440
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp			
465	470	475	480
cta ccc ggg ccc tgc tac cgg cag caa cgc gtc tcc acg aca ctg tcg			1488
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser			
485	490	495	
caa aat aac aac agc aac ttt gcc tgg acc ggt gcc acc aag tat cat			1536
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His			
500	505	510	

ctg aat ggc aga gac tct ctg gta aat ccc ggt gtc gct atg gca acc 1584

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525

cac aag gac gac gaa gag cga ttt ttt ccg tcc agc gga gtc tta atg 1632

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met  
 530 535 540

ttt ggg aaa cag gga gct gga aaa gac aac gtg gac tat agc agc gtt 1680

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

atg cta acc agt gag gaa gaa att aaa acc acc aac cca gtg gcc aca 1728

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
 565 570 575

gaa cag tac ggc gtg gtg gcc gat aac ctg caa cag caa aac gcc gct 1776

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala  
 580 585 590

cct att gta ggg gcc gtc aac agt caa gga gcc tta cct ggc atg gtc 1824

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605

tgg cag aac cgg gac gtg tac ctg cag ggt cct atc tgg gcc aag att 1872

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620

cct cac acg gac gga aac ttt cat ccc tcg ccg ctg atg gga ggc ttt 1920

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640

gga ctg aaa cac ccg cct cct cag atc ctg att aag aat aca cct gtt 1968

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
 645 650 655

ccc gcg gat cct cca act acc ttc agt caa gct aag ctg gcg tcg ttc 2016

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe



Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile  
 145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
 165 170 175

Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
 180 185 190

Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205

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

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala



Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580 585 590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile

610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe

625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val

645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe

660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

675 680 685

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

690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp

705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735

Asn Leu